

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y
BIOTRANSFORMACIÓN DE FÁRMACOS EN LA FALTA DE
RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

TESIS DOCTORAL

GABRIELA RODRÍGUEZ MACÍAS

2023

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y BIOTRANSFORMACIÓN DE FÁRMACOS EN LA FALTA DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Memoria que presenta **Dña. Gabriela Rodríguez Macías** para optar
al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 7 de marzo de 2023

D^a. M^a JESÚS MONTE RÍO, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA Y DIRECTORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y BIOTRANSFORMACIÓN DE FÁRMACOS EN LA FALTA DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA" presentada por D^a. **Gabriela Rodríguez Macías**, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, D. Óscar Briz Sánchez, Profesor Asociado del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y D^a. Sara Ortiz Rivero, Investigadora postdoctoral del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 7 de marzo de dos mil veintitrés.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Monte Río', written in a cursive style.

Fdo. M^a Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y BIOTRANSFORMACIÓN DE FÁRMACOS EN LA FALTA DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA" presentada por D^a. **Gabriela Rodríguez Macías**, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, D. Óscar Briz Sánchez, Profesor Asociado del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y D^a. Sara Ortiz Rivero, Investigadora postdoctoral del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 7 de marzo de dos mil veintitrés.



Fdo. José Juan García Marín

El Dr. José Juan García Marín, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Salamanca y Director del grupo HEVEPHARM, el Dr. Óscar Briz Sánchez, Profesor Contratado Doctor de Fisiología de la Universidad de Salamanca y D^a. Sara Ortiz Rivero, Investigadora postdoctoral del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE Y BIOTRANSFORMACIÓN DE FÁRMACOS EN LA FALTA DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA" presentada por D^a. **Gabriela Rodríguez Macías**, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y que estiman que reúne los requisitos exigidos para optar al Título de Doctora.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 7 de marzo de dos mil veintitrés.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. Óscar Briz Sánchez



Fdo. Sara Ortiz Rivero

FINANCIACIÓN

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Dirección General de Investigación Científica y Técnica del MINECO. Proyecto SAF2013-40620-R. “Implicación de los genes *NR1H4*, *BIRC5* y *SLC22A1* en la quimiorresistencia y quimiosensibilización del cáncer hepático”. Investigador Principal: José J. García Marín. 2014-2016.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. “Papel de los sistemas de transporte y biotransformación de fármacos en la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con leucemia mieloide aguda”. Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. 2015.

Fundación Mutua Madrileña. XII Convocatoria. “Papel de los sistemas de transporte y biotransformación de fármacos en la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con leucemia mieloide aguda”. Investigador Principal: Oscar Briz Sánchez. 2015-2018.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2019). Proyecto PI19/00819. “Interés pronóstico y terapéutico de las proteínas SLC y ABC en adenocarcinomas hepáticos y gastrointestinales” Investigador principal: José Juan García Marín; Óscar Briz Sánchez (coIP). Periodo: 2020-2022.

Fundación La Marató de TV3. Proyecto 201916-31 “Contribution of mitochondrial oxysterol and bile acid metabolism to liver carcinogenesis”. Coordinador: José Carlos Fernández Checa. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2020-2023.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2020) Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI20/00189 “Identificación de biomarcadores diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer biliar”. Investigadora Principal: Rocío I Rodríguez Macías. Periodo: 2021-2023.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2022). Proyecto PI22/00526. “Relación entre el splicing aberrante y la malignidad del carcinoma hepatocelular. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas” Investigador principal: José Juan García Marín; Óscar Briz Sánchez (coIP). Periodo: 2023-2025.

PUBLICACIONES

- Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados en forma de artículos científicos en las siguientes revistas:

Marin JJG, Briz O, **Rodríguez-Macías G**, Díez-Martín JL, Macias RIR. Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood Reviews* 2016; 30: 55-64.

Macias RIR, Sánchez-Martín A, **Rodríguez-Macías G**, Sánchez-Abarca LI, Lozano E, Herraéz E, Otero MD, Díez-Martín JL, Marin JJG, Briz O. Role of drug transporters in the sensitivity of acute myeloid leukemia to sorafenib. *Oncotarget* 2018; 9: 28474-28485.

Rodríguez-Macías G, Briz O, Cives-Losada C, Chillón María C, Martínez-Laperche C, Martínez-Arranz I, Buño I, González-Díaz M, Díez-Martín JL, Marin JJG and Macias RIR. Role of intracellular drug disposition in the response of acute myeloid leukemia to cytarabine and idarubicin induction chemotherapy. *“Artículo en revisión, pendiente aceptación”*

- Y se han presentado en los siguientes Congresos:

Congreso: XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)

5-8 septiembre 2016, Salamanca

Autores: A Sánchez-Martín, O Briz, **G Rodríguez-Macías**, LI Sánchez-Abarca, MD Otero, JJG Marin, RIR Macias

Título: Papel del transportoma en la sensibilidad al sorafenib en líneas celulares de leucemia mieloide aguda

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH)

20-22 octubre 2016, Santiago de Compostela

Autores: RIR Macías, A Sánchez-Martín, **G Rodríguez-Macías**, LI Sánchez-Abarca, E Lozano, R Al-Abdulla, MD Otero, JJG Marin, O Briz

Título: Papel del transportoma en la sensibilidad al sorafenib en líneas celulares de leucemia mieloide aguda

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH)

20-22 octubre 2016, Santiago de Compostela

Autores: **G Rodríguez-Macías**, O Briz, LI Sánchez-Abarca, E Herraéz, I Buño, C Martínez-Laperche, JL Díez-Martín, JJG Marin, RIR Macias

Título: Papel de la baja concentración intracelular de fármaco activo en la falta de respuesta a la quimioterapia de inducción en pacientes con leucemia mieloide aguda

Tipo de comunicación: Póster

Congreso: ACUTE LEUKEMIAS XVII. Biology and Treatment Strategies

24-27 febrero 2019, Munich (Alemania)

Autores: **G Rodríguez-Macías**, O Briz, MC Chillón, C Martínez-Laperche, I Buño, M González- Díaz, JL Díez-Martín, JJG Marin, RIR Macias

Título: Role of transport proteins and enzymes in resistance to induction chemotherapy in AML

Tipo de comunicación: Póster

ABREVIATURAS

7-AAD, 7 amino-actinomicina D
ABC, "ATP binding cassette"
PCA, principal component analysis
ADN, ácido desoxirribonucleico
ADNc, ADN complementario
Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
APAP-gluc, p-acetamidofenol β-D-glucurónido
Ara-C, citarabina
ARN, ácido ribonucleico
ARNm, RNA mensajero
ASXL1, "additional sex combs like 1"
ATRA, ácido all-transretinoico
AUC, "area under curve"
Bcl-2, "B-cell-lymphoma2"
BCRP, "breast cancer resistance protein"
c-KIT, "tyrosine protein kinase kit"
CBF, "core binding factor"
CEBPA, "CCAAT enhancer binding protein alpha"
CF, carboxifluoresceína
CEIC, comité ético de investigación clínica
cGMP, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
2-cloro-MP, yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio
CMF, citometría de flujo
CNT, "concentrative nucleoside transporter"
Ct: ciclo umbral
CYP, citocromo P-450
dCK, "deoxycytidine kinase"
DiOC2(3), yoduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina
DHE, dihidroetidio
DMSO, dimetilsulfóxido
dNTP, "deoxynucleotide thriphosphate"
EEM, error estándar de la media
ELN, "European Leukemia Net"
ENTs, "equilibrative nucleoside transporters"
FAB, clasificación franco-américo-británica

FBS, suero bovino fetal
FISH, “fluorescent *in situ* hybridization”
FITC, iostiocianato de fluoresceína
FLT3, “fms-like tyrosine kinase 3”
FTC, fumitremorgina C
5-FU, 5-fluoruracilo
GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GST, glutation-S-transferasa
h, horas
HBSS, “hanks’ balanced salt solution”
HiDAC, “high dose citarabine”
HLA, antígenos leucocitarios humanos
HMA, hipometilantes
HTC, comorbilidad trasplante hematopoyético
IC50, concentración inhibitoria 50
IDAC, “intermedium dose citarabine”
IDH, “isocitrate dehydrogenase”
IP, ioduro de propidio
ITD, “internal tandem duplication”
iv, intravenoso
KMT2A (MLL), lysine methyltransferase 2A
LLC, leucemia linfática crónica
LMA, leucemia mieloide aguda
LMC, leucemia mieloide crónica
LPA, leucemia promielocítica aguda
LPR, “lung resistance protein”
MDR, “multidrug resistance protein”
MDR1, “multidrug resistance mutation 1”
MLFS, “morphologic leukemia free state”
MO, médula ósea
MOC, mecanismo de quimiorresistencia
MPO, mieloperoxidasa
MRP, “multidrug resistance- associated protein”
MTT, sales de tetrazolio
MVP, “major vault protein”
NGS, “next generation sequencing”
NMP, neoplasias mieloproliferativas

NOS, “not otherwise specified”
NPM1, “nucleophosmin 1 gene”
NQO1, NAD(P)H deshidrogenasa-quinasa 1
NR, no respondedores
5-NT, “5-nucleotidase”
OATP, “organic anion transporting polypeptide”
OCT, “organic cation transporter”
OCTN2, “organic cation transporter 2”
OR, “odds ratio”
ORF, “open reading frame”
PBS, tampón fosfato salino
PCR, “polymerase chain reaction”
PE, ficoeritrina
PET, tomografía de emisión de positrones
QT, quimioterapia
R, respondedores
RC, remisión completa (morfológica o citológica)
RCi, remisión completa con recuperación hematológica incompleta
RMN, resonancia magnética nuclear
ROC, “receiver operating characteristic”
RP, respuesta parcial
RT, transcripción reversa
RT-qPCR, PCR cuantitativa en tiempo real
s-LMA, leucemia mieloide aguda secundaria (secundaria a otra neoplasia hematológica, por ej. Síndrome mielodisplásico)
sc, subcutáneo
SDS, dodecil sulfato sódico
SLC, “solute carrier”
SMD, síndrome mielodisplásico
SNC, sistema nervioso central
SNP, polimorfismo de nucleótido único
SP, sangre periférica
t-LMA, leucemia mieloide aguda relacionada con terapia (quimioterapia o radioterapia previa)
TAC, tomografía computerizada
TCDCA, ácido tauroquenodesoxicólico
TK, “tyrosine kinase”
TKD, “tyrosine kinase domain”

TKI, “tyrosine kinase inhibitor”

TKR, “tyrosine kinase receptor”

TP53, “tumor protein p53”

TPH, trasplante progenitores hematopoyéticos

VEGF, “vascular endothelial growth factor”

WHO, “world health organization”

ÍNDICE

1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. GENERALIDADES	7
2.2. DIAGNÓSTICO.....	9
2.3. CLASIFICACIÓN	14
2.4. FACTORES PRONÓSTICOS Y ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO.....	18
2.5. TRATAMIENTO DE LA LMA.....	20
2.5.1. Generalidades del tratamiento.....	20
2.5.2. QT de inducción	21
2.5.3. QT post-remisión.....	22
2.5.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos	23
2.5.5. Pacientes no candidatos a QT intensiva.....	23
2.5.6. Nuevos tratamientos.....	24
2.6. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA EN LA LMA	27
2.6.1. Generalidades y clasificación	27
2.6.2. Transportadores de captación de fármacos: MOC-1a	29
2.6.3. Transportadores implicados en el eflujo de fármacos: MOC-1b.....	32
2.6.4. Enzimas responsables del metabolismo de fármacos: MOC-2	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
3.1.1. Pacientes y muestras	41
3.1.2. Líneas celulares	43
3.2. MATERIAL.....	44
3.2.1. Productos	44
3.2.2. Medios instrumentales.....	45
3.3. CULTIVOS CELULARES.....	46
3.3.1. Determinación de la viabilidad celular.....	47
3.3.2. Evaluación de la apoptosis/necrosis.....	47

3.4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA	48
3.4.1. Extracción de ARN total.....	48
3.4.2. Transcripción reversa (RT)	49
3.4.3. Diseño de cebadores.....	49
3.4.4. Realización de la PCR cuantitativa	50
3.5. ESTUDIOS DE TRANSPORTE	50
3.5.1. Experimentos de captación para el estudio de OCT1	51
3.5.2. Experimentos de eflujo para el estudio de proteínas ABC	52
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. EFECTOS DE LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE FÁRMACOS EN LA RESPUESTA DE LA LMA A LA QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN CON CITARABINA E IDARRUBICINA.....	55
4.1.1. Características de los pacientes con nuevo diagnóstico de LMA.....	58
4.1.2. Relación entre la expresión de transportadores de fármacos y enzimas y la respuesta a la quimioterapia de inducción.....	61
4.1.3. Determinación de la sensibilidad a citarabina e idarrubicina en líneas celulares derivadas de LMA	66
4.1.4. Impacto de la exposición a citarabina e idarrubicina sobre la expresión de transportadores y enzimas en líneas celulares derivadas de LMA	67
4.1.5. Estudios funcionales de transporte de idarrubicina en líneas celulares derivadas de LMA.....	68
4.2. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE MEMBRANA EN LA SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA AL SORAFENIB77	
4.2.1. Efecto citostático del sorafenib en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana	80
4.2.2. Niveles basales de expresión de transportadores de membrana para el sorafenib en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana	83
4.2.3. Efecto del sorafenib sobre la expresión de transportadores de membrana en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana.....	88
4.2.4. Estudios funcionales de transporte en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana	90
5. CONCLUSIONES	97
6. BIBLIOGRAFÍA.....	101

Objetivos

La leucemia mieloide aguda (LMA), es el tipo de leucemia aguda más frecuente en el adulto. Es una neoplasia clonal, genéticamente compleja y heterogénea de los progenitores hematopoyéticos, con un comportamiento clínico y una respuesta al tratamiento igualmente heterogéneos.

Los avances en el conocimiento de la biología de la célula leucémica están transformado el panorama terapéutico de la LMA, con el desarrollo de nuevos tratamientos, que van más allá de la quimioterapia convencional, incluyendo terapias dirigidas como inhibidores de receptores con actividad tirosina- kinasa (TKIs) e inmunoterapia. Sin embargo, la quimioterapia de inducción con el esquema típico de 7+3, que consiste en la administración intravenosa de citarabina en infusión continua durante 7 días e idarrubicina o daunorrubicina administrada en bolo durante 3 días, continúa siendo desde hace 5 décadas el tratamiento de elección en los pacientes candidatos a tratamiento intensivo. Desafortunadamente la quimiorresistencia o falta de respuesta a la farmacoterapia es un problema frecuente y en última instancia uno de los principales factores responsables de los escasos resultados que frecuentemente se obtienen tras el tratamiento. Identificar los mecanismos de quimiorresistencia (MOC, del inglés “mechanisms of chemoresistance”) que intervienen en cada paciente y en cada momento de la evolución de la leucemia (antes, durante y después de la quimioterapia) es una cuestión que tiene una gran relevancia clínica. Sin embargo, a pesar de que han sido ampliamente estudiados durante la última década, existen muchas cuestiones por resolver.

En base a estos antecedentes se planteó como “**objetivo general**” de esta Tesis Doctoral ampliar el conocimiento de los factores implicados en la respuesta al tratamiento quimioterápico estándar de inducción a la remisión (esquema 7+3) y a un TKI, concretamente el sorafenib. Para ello, nos planteamos estudiar los MOCs que determinan la cantidad de fármaco activo en el interior de las células leucémicas, es decir, los MOC-I (transportadores de captación y bombas exportadoras) y MOC-II (enzimas implicadas en el metabolismo del fármaco activando profármacos o inactivando agentes activos).

Para alcanzar con éxito este objetivo se definieron tres objetivos parciales:

Objetivo 1º: Investigar el papel de los transportadores implicados en la captación y la exportación de citarabina e idarrubicina y de las enzimas metabolizadoras de fármacos presentes en las células leucémicas, que en adelante denominaremos “blastos”, en la respuesta de los pacientes con LMA a la quimioterapia de inducción (esquema 7+3), así como evaluar si los niveles de expresión en los blastos obtenidos en el momento del diagnóstico podrían ser útiles para predecir la falta de respuesta al tratamiento.

Objetivo 2º: Evaluar la sensibilidad a la citarabina y a la idarrubicina en líneas celulares leucémicas, así como el efecto de su exposición sobre los niveles de expresión de las bombas exportadoras de fármacos y de las enzimas relacionadas con su transformación metabólica dentro de las células diana.

Objetivo 3º: Investigar la contribución de los transportadores de membrana responsables de la captación y la exportación del sorafenib y sus principales dianas celulares a la sensibilidad de líneas celulares derivadas de LMA a este fármaco. Así como determinar el impacto del tratamiento con sorafenib sobre la expresión de transportadores de los fármacos de interés en líneas celulares de LMA.

Introducción

2. INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica, clonal, heterogénea y genéticamente compleja de las células progenitoras hematopoyéticas, caracterizada por la alteración de la hematopoyesis normal (stop madurativo, conocido como “hiatus leucémico”) y por la inducción de la proliferación anormal de células de estirpe mieloide o células leucémicas (blastos), con acumulación en la médula ósea y/o en otros tejidos. En la última década se ha producido un gran avance en el conocimiento de la fisiopatología de esta neoplasia que ha permitido una mejor estratificación del riesgo al diagnóstico. Además, se han desarrollado nuevos fármacos, algunos recientemente aprobados e incluidos en la práctica clínica (Daver *et al.* 2020) y se ha mejorado en la selección de estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo individualizado de cada paciente, avanzando hacia un tratamiento más personalizado, con la esperanza de mejorar el porcentaje de curación. A pesar de estos avances, los resultados tras el tratamiento con quimioterapia (QT) a largo plazo todavía siguen siendo desalentadores y un alto porcentaje de pacientes fallecen debido a la LMA.

2.1. GENERALIDADES

La LMA es la leucemia aguda más frecuente en el adulto, supone un 1,0% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados en Estados Unidos (SEER 2020). Aunque puede aparecer a cualquier edad, la incidencia es mayor en pacientes de edad avanzada, con una mediana de edad al diagnóstico de 68 años. La incidencia aumenta progresivamente con la edad, desde 2,4 casos por cada 100.000 adultos menores de 60 años a 16-18 casos por 100.000 personas mayores de 70 años, estas cifras son similares en Europa y Estados Unidos (Dores *et al.* 2012; Sant *et al.* 2010). Múltiples factores hormonales, medioambientales y genéticos se han relacionado con una predisposición individual al desarrollo de LMA, siendo esta ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres. Adicionalmente, la exposición prolongada a petroquímicas, disolventes como el benceno, pesticidas y radiaciones ionizantes, son factores claramente establecidos (Shallis *et al.* 2019), mientras que, factores genéticos como la susceptibilidad individual secundaria a alteraciones o mutaciones presentes en la línea germinal pueden aumentar el riesgo de desarrollar LMA con una incidencia de hasta el 10% (Kohlmann *et al.* 2016). Además, los antecedentes de otras neoplasias hematológicas previas, como síndromes mielodisplásicos (SMD) o neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) y la exposición a agentes quimioterápicos y/o radioterapia también se asocian a una mayor probabilidad de desarrollar LMA (Ades *et al.* 2014; McNerney *et al.* 2017; Tefferi *et al.* 2015).

Las nuevas técnicas de alto rendimiento, como la secuenciación masiva, han aumentado el conocimiento molecular y la comprensión de los mecanismos implicados en el desarrollo de la LMA, confirmando que es una enfermedad genéticamente heterogénea, caracterizada por múltiples mutaciones (somáticas y/o en la línea germinal) y/ o alteraciones epigenéticas que afectan a genes de diferentes categorías, con una arquitectura clonal compleja y dinámica en continua evolución a lo largo del tiempo (Bullinger *et al.* 2017; Papaemmanuil *et al.* 2016).

Durante 50 años se ha utilizado el mismo tratamiento de QT de inducción a la remisión para los pacientes con LMA candidatos a tratamiento intensivo, conocido como “7+3” (Yates *et al.* 1973), basado en la combinación de citarabina en infusión continua intravenosa (iv) durante 7 días y una antraciclina (idarrubicina o daunorrubicina) durante 3 días igualmente iv. Con esta combinación, hasta 60-85% de los pacientes menores de 60 años y 40-60% de los pacientes mayores de 60 años alcanzan remisión tras 1 ó 2 ciclos de QT (Dohner *et al.* 2015). Tras la inducción, es fundamental el tratamiento post-remisión (en los pacientes capaces de tolerar tratamiento quimioterápico intensivo), bien con QT entre 2-4 ciclos habitualmente con citarabina iv en dosis intermedias o altas o con trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) que, hoy por hoy, es la opción con más probabilidad de curación a largo plazo. Los pacientes que no reciben tratamiento post-remisión habitualmente progresan entre 6 y 9 meses.

En las dos últimas décadas, la mejor estratificación de la LMA (caracterización citogenética y molecular) y las mejoras en el tratamiento de soporte han supuesto un ligero aumento en la supervivencia global en los pacientes jóvenes, logrando tasas del 40-50% a 5 años. Sin embargo, en los mayores de 60 años, que son la mayoría de los pacientes con LMA, la supervivencia global a 5 años no supera el 10%, debido fundamentalmente a que muy pocos son candidatos a QT intensiva por la toxicidad y morbi-mortalidad asociada al tratamiento, y a que el porcentaje de respuesta a la QT es mucho menor que en los pacientes jóvenes en probable relación con las características biológicas de la LMA (Appelbaum *et al.* 2006). La incorporación de fármacos hipometilantes (HMA), como azacitidina o decitabina, al tratamiento de los pacientes no candidatos a QT intensiva, amplió el número de pacientes mayores de 65 años que recibían tratamiento, pero con un porcentaje de respuesta bajo (20-30%) y corta duración, al menos cuando se utilizan en monoterapia (Dombret *et al.* 2015; Kantarjian *et al.* 2012). Nuevas terapias, como el inhibidor de la proteína 2 del linfoma de células B (Bcl-2), Venetoclax en combinación con HMA, han supuesto el primer gran cambio en el panorama terapéutico, consiguiendo aumentar el porcentaje y duración de las respuestas de los pacientes no candidatos a QT intensiva (Daver *et al.* 2020; DiNardo *et al.* 2020; DiNardo *et al.* 2020).

Una excepción a las cifras anteriores son los pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA), un subtipo de LMA que representa entre el 5-10% del total de casos y que se

caracteriza por la presencia de la translocación t(15;17), que genera un gen de fusión “PML-RAR α ”, responsable de las características clínicas y biológicas de este subgrupo de LMA, con presencia de coagulopatía al diagnóstico con alto riesgo trombo-hemorrágico y mortalidad al diagnóstico y una alta tasa de respuesta y curación (hasta 90%) tras tratamiento basado en el uso de ácido all-trans-retinoico (ATRA) en combinación con antraciclinas y/o trióxido de arsénico (2013-Lo-Coco-23841729 (Cicconi *et al.* 2016; Lo-Coco *et al.* 2013; Sanz *et al.* 2019). Por estas características y el tratamiento específico de esta entidad, no incluimos este subtipo de LMA en nuestro estudio.

2.2. DIAGNÓSTICO

Los signos y síntomas de la LMA son diversos e inespecíficos en el momento del diagnóstico y se deben, principalmente, a la infiltración leucémica de la médula ósea y/o los tejidos, lo que se traduce en citopenias y, por lo tanto, en clínica de anemia, infecciones severas y/o hemorragias por trombopenia y/o coagulación intravascular diseminada asociada en algunos subtipos. También es frecuente que aparezcan manifestaciones secundarias a la infiltración leucémica en otros órganos, como el sistema nervioso central, hígado, el bazo, o los ganglios linfáticos.

Ante un paciente con sospecha de LMA, se realiza una historia clínica completa, una exploración física y estudios de laboratorio que incluyen: hemograma, coagulación y bioquímica completa. El diagnóstico inicial se puede realizar en sangre periférica (SP) si se objetiva más de un 20% blastos, pero la confirmación se realiza en una biopsia-aspirado de médula ósea (Arber *et al.* 2016), en la que se realizan estudios para la caracterización biológica de la LMA: i) Citogenética (cultivo celular y análisis de metafases, para conocer el cariotipo de las células leucémicas) y/o hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de forma complementaria si no crecen suficientes metafases (al menos 20), ii) Estudio molecular mediante técnicas de PCR y/o secuenciación para la determinación de las alteraciones moleculares y iii) Citometría de flujo.

La **citogenética** convencional continúa siendo un estudio obligatorio y fundamental al diagnóstico en los pacientes con sospecha de LMA. Permite realizar una primera estratificación de los pacientes, en función de la presencia o no de alteraciones, en 3 grupos de riesgo citogenético: bajo, intermedio y adverso (Tabla I-1), asociado con probabilidad de remisión, riesgo de recaída y supervivencia global (Grimwade *et al.* 2010), que influirá en las decisiones de tratamiento. Si el estudio citogenético falla (no se obtienen suficientes metafases, aspirado seco, etc) se complementa con FISH y/o secuenciación para caracterizar lo mejor posible la LMA.

Tabla I-1. Grupos de riesgo citogenético.

Catalogación de riesgo citogenético	
Favorable	inv(16) o t(16;16)
	t(8;21)
	t(15;17)
Intermedio	Citogenética normal
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Otras alteraciones no incluidas en riesgo favorable o adverso
Adverso	Cariotipo complejo*: ≥ 3 alteraciones.
	Cariotipo monosómico#.
	-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
	t(v;11q23.3); reordenamiento KMT2A no t(9;11)
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i>
t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	
t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> &	

* Tres o más alteraciones cromosómicas, en ausencia de 1 de las translocaciones recurrentes descritas en la WHO, como, t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); AML con BCR-ABL1.

Definido por la presencia de 1 única monosomía (excluyendo pérdida de X o Y) en asociación con al menos 1 monosomía estructural o alteración cromosómica estructural (excluyendo “core-binding factor” LMA).

& LMA BCR-ABL, requiere > 20% blastos, para diferenciarla de la LMC en crisis blástica y podría beneficiarse de añadir TKI al tratamiento.

(modificado de (Dohner *et al.* 2017; Grimwade *et al.* 2010; NCCN-v3.2022 2022))

El **estudio molecular** aporta en la actualidad mucha información. El descubrimiento y validación de múltiples alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de la LMA en la última década ha permitido caracterizar y, por lo tanto, clasificar mejor a los pacientes con nuevo diagnóstico de LMA, en especial a los de riesgo citogenético intermedio, ya que es un grupo muy heterogéneo en cuanto a respuesta y supervivencia. Ciertas alteraciones moleculares permiten reclasificar a los pacientes hacia riesgo bajo o alto y tienen valor en la posterior decisión de su tratamiento post-remisión. Además, algunas alteraciones moleculares han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, actualmente en investigación en múltiples

ensayos clínicos y algunos ya incluidos en la práctica clínica (Daver *et al.* 2020). En la tabla I-2, se presentan algunas de las mutaciones en genes con mayor impacto por su frecuencia e importancia pronóstica y por ser posibles dianas terapéuticas.

Tabla I-2. Alteraciones moleculares relevantes con impacto pronóstico y/o terapéutico.

Gen	Frecuencia	Impacto Pronóstico	Comentarios
FLT3	20-25% (ITD) 5-10% (TKD)	Supervivencia inferior (ITD) Significado incierto (TKD)	Mutación más frecuente en LMA con CN Se asocia a hiper-leucocitosis y alta proliferación Múltiples inhibidores de FLT3 ya en práctica asistencial y en desarrollo ¹
NPM1	30%	Supervivencia mayor en ausencia de mutaciones en FLT3-ITD	Más común en LMA con CN Con frecuencia asociado a mutaciones en DNMT3A, FLT3 y IDH1/2 Puede ser útil para monitorizar EMR mediante PCR Pronóstico influenciado por el estatus mutacional de FLT3 ²
CEBPA	10%	Supervivencia mayor si la mutación ocurre en el marco de lectura de la región "zipper" CEBPA ³	Descritas mutaciones en línea germinal con predisposición familiar
KIT	10%	Podría conferir una supervivencia inferior cuando se asocia a LMA-CBF	Presente hasta 24-35% LMA-CBF, confiriendo un peor pronóstico, en especial cuando se asocia a t(8;21). Inhibidores KIT como Dasatinib han sido evaluados en diferentes estudios
KMT2A	2% ⁴	Impacto pronóstico intermedio/adverso en función del reordenamiento asociado	Previamente conocido como "Mixed Lineage Leukemia" (MLL). Puede estar reordenado con múltiples "partners" En desarrollo terapias dirigidas
DNMT3A*	20%	Impacto pronóstico incierto	Más frecuente en LMA con CN Su incidencia aumenta con la edad Es una mutación CHIP ⁵
IDH1* IDH2*	5-15% (IDH1) 10-20% (IDH2)	Impacto pronóstico incierto	Más frecuente en LMA con CN Su incidencia aumenta con la edad Es una mutación CHIP ⁵
NRAS	15%	Impacto pronóstico incierto	Inhibidores de rutas de señalización de RAS en desarrollo
TET2*	5-15%	Impacto pronóstico incierto	Más frecuente en LMA con CN Su incidencia aumenta con la edad Es una mutación CHIP ⁵
ASXL1*	5-15%	Impacto pronóstico adverso	Su incidencia aumenta con la edad. Asociada a evolución de otras Neoplasias hematológicas (SMD, SMP) Es una mutación CHIP ⁵
RUNX1	5-20%	Impacto pronóstico adverso	Su incidencia aumenta con la edad y con frecuencia se asocia a LMA secundaria. También se ha descrito asociada a línea germinal con predisposición familiar.
TP53	5-20%	Impacto pronóstico adverso	Su incidencia aumenta con la edad. Se asocia a CC y MK y LMA secundaria a neoplasia previa y/o antecedente de QT y/o RT.

CBF, "core binding factor"; CC, cariotipo complejo; CHIP, "clonal hematopoiesis of indeterminate potential"; CN, cariotipo normal; EMR, enfermedad mínima residual; ITD, "internal tandem duplication"; LMA, leucemia mieloide aguda; MK, cariotipo monosómico; PCR, "polymerase chain reaction"; QT, quimioterapia; RT, radioterapia; SMD, síndrome mielodisplásico; SMP, síndrome mieloproliferativo; TKD, dominio tirosin quinasa. *Mutaciones en genes reguladores epigenéticos

¹(Zhao *et al.* 2022); ²(Short *et al.* 2018); ³(Wakita *et al.* 2022); ⁴(Mrozek 2022); ⁵(Jaiswal *et al.* 2014) (modificado de (Short *et al.* 2018)).

Los estudios moleculares mínimos para realizar de forma asistencial en los pacientes con LMA según la European Leukemia NET (Dohner *et al.* 2017) son: i) Análisis mutacional de *NPM1* (“nucleophosmin 1”), *CEBPA* (“CCAAT/enhancer binding protein Alpha”) y *RUNX1* por ser genes que definen 3 categorías o entidades específicas incluidas en esta clasificación; ii) Mutaciones *FLT3* (“Fms-like tyrosine kinase 3”), tanto en el dominio tirosina kinasa (TKD), como en las repeticiones internas del tándem (ITD del inglés “internal tandem duplication”). Las mutaciones de *FLT3* tienen relevancia pronóstica y terapéutica; las que afectan a ITD confieren un pronóstico adverso, no estando claro el papel de las mutaciones en TKD, pero ambas son importantes por el desarrollo de moléculas inhibitoras FLT3 (algunos actúan sobre ambas mutaciones y otros sólo sobre mutaciones ITD); iii) mutaciones de *TP53* y *ASXL1* por su impacto pronóstico adverso.

El estudio molecular se puede realizar mediante PCR con resultados que suelen estar disponibles en 5-7 días y complementar con un panel obtenido mediante secuenciación de nueva generación (NGS de “next-generation sequencing”), cuyos resultados van a estar en una media de 2-3 semanas según laboratorio/centro diagnóstico. Si existe sospecha de predisposición en línea germinal, se debe remitir a un laboratorio especializado para realizar un panel que incluya el estudio de genes conocidos.

La identificación de mutaciones en determinados genes como *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *KMT2A* (anteriormente conocido como MLL: “myeloid-lymphoid” o “mixed-lineage leukemia”), *c-KIT* (“tyrosine-protein kinase Kit”), *IDH1* y *IDH2* (isocitrato deshidrogenasa 1 y 2), *TP53*, *RUNX1*, será por tanto útil, tanto para la estratificación del riesgo, como para el tratamiento (Dohner *et al.* 2017);(Tallman *et al.* 2019) permitiendo el uso de nuevas moléculas dirigidas frente a determinadas alteraciones; como los inhibidores de FLT3 (sorafenib, midostaurina, quizatirib, crenolanib, gilteritinib) o los inhibidores de IDH1 (ivosidenib) e IDH2 (enasidenib) en monoterapia y/o combinación con QT, HMA, u otros, con el objetivo de mejorar los resultados de tratamiento de los pacientes con LMA.

La **citometría de flujo** (CMF) es otra técnica complementaria que ayuda a confirmar el linaje de los blastos e identificar la expresión aberrante de antígenos de diferenciación que expresa cada LMA, además de la detección residual de blastos que podrían parecer normales por un análisis morfológico convencional (Tabla I-3). Por lo tanto, el estudio mediante citometría de flujo es fundamental en la confirmación de la remisión completa (RC) tras QT y el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR; también denominada enfermedad medible residual) en el trascurso del tratamiento. Tanto la CMF como los marcadores moleculares (estudio realizado mediante PCR y/o NGS) específicos de cada LMA, permiten el seguimiento de la EMR en la LMA aportando información pronóstica y con impacto terapéutico (Schuurhuis *et al.* 2018);(Jongen-Lavrencic *et al.* 2018). Recientemente, se ha confirmado la importancia de alcanzar RC con EMR negativa tras 2 ciclos por su impacto en la supervivencia global y en la

supervivencia libre de enfermedad, de tal forma que en pacientes con riesgo favorable o intermedio al diagnóstico con EMR positiva tras 2 ciclos, hay que plantear el Alo-TPH como tratamiento post-remisión, mientras que si es negativa, los pacientes de bajo riesgo continuarán con QT post-remisión y en los pacientes de riesgo intermedio las dos opciones podrían ser aceptadas (QT/Alo-TPH).

Tabla I-3. Expresión de marcadores citoplasmáticos y de superficie celular para el diagnóstico de LMA.

Estirpe celular	Marcadores
Precusores	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulocitos	CD65, MPO citoplasmática
Monocitos	CD14, CD36, CD64
Megacariocitos	CD41, CD61
Eritroides	CD235a (glicoforina A), CD36

HLA-DR, "human leukocyte antigens"; MPO, Mieloperoxidasa; (adaptada de (Dohner *et al.* 2017).

La proliferación de blastos en una localización extra-medular (también conocida como "cloroma"), puede ser una manifestación más de la LMA, tanto al diagnóstico, como en la recaída y puede ser la única expresión de LMA en un paciente de nuevo diagnóstico, entidad reconocida en la clasificación WHO 2016 como sarcoma mielóide (Arber *et al.* 2016). El diagnóstico de la presentación extra-medular requiere de técnicas de imagen, como la tomografía axial computerizada (TAC), la resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía por emisión de positrones (PET) o combinaciones como PET-TAC. La afectación del sistema nervioso central (SNC) en pacientes con LMA tiene una incidencia de aproximadamente 3% (NCCN-v3.2022 2022), aunque algunas publicaciones recientes sugieren que puede llegar al 20-30% (Rozovski *et al.* 2015);(Del Principe *et al.* 2018). Se debe realizar punción lumbar y administración de QT intratecal a los pacientes con síntomas neurológicos al diagnóstico (tras prueba de imagen que no contraindiquen su realización y que permitan descartar afectación parenquimatosa y/o leptomeníngea). En los pacientes con riesgo de afectación del SNC al diagnóstico, que son aquellos con morfología monocítica, recuento total de leucocitos >40.000 células/ μ l, FLT3 positivos, afectación extramedular y en leucemia aguda de fenotipo mixto (NCCN v2.2022 guidelines) se realiza la punción lumbar y administración de profilaxis con QT intratecal (metotrexato, citarabina e hidrocortisona) tras un primer ciclo de QT y una vez confirmada la remisión (para evitar contaminación de SP).

Al mismo tiempo que se diagnostica la LMA se evalúa la situación basal del paciente, conociendo las comorbilidades, incluyendo la evaluación de la función cardíaca mediante pruebas de imagen como la ecocardiografía, para valorar la utilización de antraciclina y/o

fármacos cardiotoxicos y calcular la mortalidad asociada al tratamiento con QT y/o Alo-TPH (Sorrer *et al.* 2017) para decidir si el paciente es candidato a tratamiento intensivo, en especial en pacientes de >60-65 años.

Igualmente, en paralelo al diagnóstico se realizan pruebas de histocompatibilidad o estudio del tipaje HLA (antígeno leucocitario humano) a todos los pacientes con LMA que puedan ser candidatos a Alo-TPH en primera remisión para iniciar la valoración de los posibles candidatos como donantes disponibles para el paciente.

La LMA puede aparecer: i) *de novo*, o ii) de forma secundaria (s-LMA) en pacientes con antecedentes de neoplasia hematológica, como SMD y/o NMP o que hayan recibido tratamiento con QT y/o radioterapia (RT) por una neoplasia previa, LMA asociada a tratamiento (t-LMA) entidad reconocida hasta ahora por la OMS (Arber *et al.* 2016).

En resumen, la evaluación inicial de los pacientes con LMA tiene fundamentalmente 2 objetivos: i) determinar las características biológicas de la enfermedad, que va a proporcionar información pronóstica, de sensibilidad a la QT y riesgo de recaída como son la exposición previa a QT y/o RT, antecedentes de neoplasia hematológica, alteraciones citogenéticas y/o moleculares, y ii) identificar factores específicos del paciente que pueden afectar a la capacidad individual de tolerar la QT y/o Alo-TPH, como la edad y/o la presencia de comorbilidades (Sorrer *et al.* 2017). Ambos objetivos son fundamentales para decidir el tratamiento.

2.3. CLASIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, la LMA es una enfermedad compleja y heterogénea, con variabilidad clínica y biológica que influye en la respuesta al tratamiento y/o posible recaída. Por ello, es importante una vez confirmado el diagnóstico, clasificar la enfermedad y estratificar a los pacientes en grupos de riesgo que nos permitan decidir el mejor tratamiento post-remisión en función de dicho riesgo.

Históricamente, la primera clasificación de la LMA fue el sistema descriptivo franco-américo-británico (FAB) (Bennett *et al.* 1976), basado en el tipo de célula afectada y en el grado de diferenciación determinado por la citomorfología. Esta clasificación se ha mantenido vigente hasta principios de los años 2000.

Entre 1990 y 2003 se publicaron las primeras recomendaciones para el diagnóstico y evaluación de la respuesta de los pacientes con LMA con el fin de estandarizar y así ayudar a la interpretación de los datos clínicos de forma más objetiva y comparación de resultados

entre diferentes ensayos clínicos. La tabla I-4 muestra las definiciones de los criterios de respuesta (Cheson *et al.* 1990);(Cheson *et al.* 2003).

Tabla I-4. Criterios de respuesta en LMA.

Categoría	Definición	Comentario
Respuesta		
RC.EMR-	Remisión Completa y no evidencia de LMA; enfermedad mínima residual negativa. (marcador molecular o citometría de flujo)	La sensibilidad puede variar en función del marcador estudiado y de la metodología. Realizar estudios en laboratorios experimentados
RC	<5%blastos en MO; No blastos en SP, no enfermedad extramedular Neutrófilos > 1000 /ul; Plaquetas >100.000/ul	EMR positiva o desconocida
RCi	Cumple todos los criterios de RC, excepto recuperación incompleta (Neutrófilos < 1000/ul o Plaquetas < 100.000/ul)	
MLFS	5% blastos en MO; ausencia de blastos con bastones de Auer, ausencia de enfermedad extramedular; recuperación hematológica no es requerida	La MO no debe estar aplásica; al menos 200 células contabilizadas o celularidad > 10%
RP	Criterios hematológicos de RC; descenso del % de Blastos en MO del 5-25%; descenso del % de Blastos con respecto al diagnóstico del 50%	De interés en Ensayos clínicos
Fallo de respuesta		
Refractario Primario	No RC o no RCi tras 2 ciclos de QT. Excluidos pacientes con muerte en aplasia o por otras causas	
Muerte en aplasia	Muerte > 7 días tras finalizar QT, en aplasia post-QT, sin evidencia de LMA	
Muerte de causa indeterminada	Muerte antes de finalizar QT o 7 días después, o muerte 7 días de finalizar QT, pero sin blastos en SP y MO no disponible	

EMR-, enfermedad mínima residual negativa; MLFS, "morphologic leukemia free status"; MO, médula ósea; RC, remisión completa; RCi, remisión completa con recuperación hematológica incompleta; RP, respuesta parcial; SP, sangre periférica.

En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Arber 2001) desarrolló un nuevo sistema de clasificación que incluía la citogenética, la evidencia o no de displasia y su correlación con los subtipos de la clasificación FAB. Esta clasificación ha ido evolucionando a medida que se han ido conociendo las características citogenéticas y moleculares de la LMA, con una primera actualización en el 2008 que integraba por primera vez aspectos genéticos, inmunofenotípicos, biológicos y clínicos de la LMA. Esto permitió definir "entidades específicas" de la enfermedad, con un comportamiento biológico y clínico más homogéneo, como las LMA con alteraciones genéticas recurrentes Swerdlow (Swerdlow *et al.* 2008);(Campo *et al.* 2011); (Dohner *et al.* 2010). Desde entonces han sufrido diferentes variaciones adaptándose al avance del conocimiento en este campo.

La disponibilidad de técnicas de secuenciación masiva (Cancer Genome Atlas Research *et al.* 2013);(Papaemmanuil *et al.* 2016) han ido revelando y validando nuevas alteraciones moleculares con relevancia clínica y pronóstica, lo que llevó a una nueva actualización de la clasificación de la WHO en el 2016 (Arber *et al.* 2016) de las neoplasias mieloides y leucemias agudas con las siguientes categorías (Tabla I-5): i) LMA con alteraciones genéticas recurrentes, ii) LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, iii) LMA relacionadas con terapia, iv) LMA NOS (“Not otherwise specified”), v) Sarcoma mieloides, vi) Proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down vii) Neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, y viii) Leucemia Aguda de linaje “ambiguo” ix); Neoplasias mieloides asociadas a línea germinal.

En 2022, de nuevo se ha actualizado la clasificación de la OMS (“5th WHO classification of myeloid neoplasms”) (Khoury *et al.* 2022). y se ha publicado una nueva clasificación ICC (“International Consensus Classification”) (Dohner *et al.* 2022), enfatizando ambas, en la integración del análisis molecular en la práctica clínica diaria. Las diferencias entre la ICC y las principales revisiones del anterior sistema de la OMS de 2016 plantean tanto retos como oportunidades para la atención y la investigación clínica (Shimony *et al.* 2023), pero no son incluidas en la revisión por ser nuestro estudio previo a estos cambios.

Tabla I-5. Clasificación de LMA WHO 2016 (Arber *et al.* 2016).

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) y NEOPLASIAS RELACIONADAS
LMA con anomalías genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
LMA con PML-RARA
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
LMA con inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
<i>Entidad provisional: LMA con BCR-ABL1</i>
LMA con NPM1 mutado
LMA con mutaciones bialélicas CEBPA
<i>Entidad provisional: LMA con RUNX1 mutado</i>
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con tratamiento (t-LMA)
LMA sin especificar
LMA con mínima diferenciación
LMA sin maduración
LMA con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monocítica/monoblástica aguda
Leucemia eritroide pura
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia aguda basofílica
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down
Mielopoyesis anormal transitoria
Leucemia mieloide asociada a síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas blástica
Leucemia aguda de linaje ambiguo
Leucemia aguda indiferenciada
MPAL con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
MPAL con t(v;11q23.3); reordenamiento KMT2A
MPAL B/mieloide, neoplasia sin especificar
MPAL T/mieloide, neoplasia sin especificar
Neoplasia mieloide con predisposición en línea germinal sin enfermedad previa o disfunción de órgano
LMA con CEBPA mutado (línea germinal)
Neoplasia mieloide con mutación en DDX41
Neoplasia mieloide con predisposición en línea germinal y alteración plaquetaria preexistente
Neoplasia mieloide con mutación en línea germinal de RUNX1
Neoplasia mieloide con mutación en línea germinal de ANKRD26
Neoplasia mieloide con mutación en línea germinal de ETV6
Neoplasia mieloide con predisposición en línea germinal y disfunción de órgano
Neoplasia mieloide con mutación en línea germinal de GATA2
Neoplasia mieloide asociada a síndromes de fracaso medular
Leucemia mielomonocítica juvenil con neurofibromatosis, Síndrome Noonan, Síndrome Noonan-like con neurofibromatosis
Neoplasia Mieloide asociada con síndrome de Down

2.4. FACTORES PRONÓSTICOS Y ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO

Los factores pronósticos en la LMA pueden dividirse fundamentalmente en dos grupos: los relacionados con el paciente y los relacionados con las características biológicas de la LMA. Dentro de los relacionados con el paciente, la edad avanzada es un factor pronóstico adverso independiente, pero el estado funcional y la presencia de comorbilidades son los que influyen directamente en las decisiones terapéuticas (Appelbaum *et al.* 2006);(Sorró *et al.* 2017).

Al diagnóstico, los factores relacionados con la LMA incluyen: el recuento total de leucocitos, la existencia de neoplasia hematológica previa (s-LMA), la exposición previa a citotóxicos y/o radioterapia (t-LMA), la caracterización genética (citogenética y marcadores moleculares en células leucémicas al diagnóstico) y la respuesta a la terapia de inducción.

Las características biológicas de la LMA se van a definir por los resultados de la citogenética y alteraciones moleculares presentes al diagnóstico. El estudio citogenético distribuye a los pacientes en 3 grandes grupos de riesgo (tabla I-1) como se ha comentado en el diagnóstico (Grimwade *et al.* 2010).

Los pacientes con LMA con alteraciones citogenéticas como son t(8;21) (q22;q22): *RUNX1-RUNX1T1* e inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22): *CBFB-MYH11*, grupo denominado “Core Binding Factor Leukemia” (CBF), se asocian con una evolución relativamente favorable, con una alta probabilidad de respuesta y curación con QT. Igualmente en el grupo citogenético favorable están los pacientes con LPA con t(15;17)(q22;q21); *PML-RARA* con alta tasa de curación (Sanz *et al.* 2019).

Sin embargo, los pacientes con alteraciones citogenéticas tales como las deleciones 3q (abn(3q)), y 5q (del(5q)), monosomías de los cromosomas 5 y/o 7 (-5/-7), o con un cariotipo complejo (≥ 3 anomalías no relacionadas, no incluidas en el subgrupo de LMA con anomalías genéticas recurrentes) se asocian con un pronóstico adverso (Grimwade *et al.* 2010). Por otra parte, los pacientes con cariotipo monosómico (MK), definido como ≥ 2 monosomías o una única monosomía junto a la presencia de anomalías estructurales, constituyen un subgrupo de LMA con un pronóstico extremadamente adverso (Medeiros *et al.* 2010).

La principal limitación de la citogenética es que hasta un 50% de los pacientes con LMA son clasificados dentro del grupo intermedio (Tabla I-1), con hasta un 40-50% de ellos con cariotipo normal/desconocido (no crecimiento de metafases), siendo los resultados clínicos muy distintos en este subgrupo de pacientes. La identificación y validación de nuevas mutaciones genéticas con repercusión pronóstica, permite clasificar mejor a los pacientes con LMA inicialmente incluidos dentro del grupo intermedio según el riesgo citogenético molecularmente muy heterogéneo.

Las mutaciones en los genes *NPM1*, *FLT3*, y *CEBPA*, de forma individual o combinada, se han asociado con la respuesta al tratamiento en pacientes con citogenética normal. En la actualidad, el análisis citogenético y el *estatus* mutacional al diagnóstico “mutaciones moleculares”, se realiza de forma integral, aportando información, en particular en LMA con citogenética normal.

En 2010 la ELN propuso una estratificación de los pacientes con LMA (sin incluir a los pacientes con LPA, con recomendaciones publicadas de forma separada) en base a la citogenética y a los marcadores moleculares al diagnóstico (Dohner *et al.* 2010);(Sanz *et al.* 2019))

Tabla I-6. Clasificación del riesgo ELN 2017 (adaptada de (Dohner *et al.* 2017)).

Categoría de riesgo	
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 NPM1 mutado y FLT3-ITD ^{high} NPM1 mutado, FLT3 no mutado o FLT3-ITD ^{low} CEBPA mutado bialélico
Intermedio	NPM1 mutado y FLT3-ITD ^{high} NPM1 no mutado, FLT3 no mutado o FLT3-ITD ^{low} (sin lesiones genéticas de riesgo adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT-KMT2A Alteraciones citogenéticas no clasificadas como riesgo adverso
Adverso	t(6;9)(q23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); reordenamiento KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL inv3(q21.3q26.2) o t(3;3) (q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV1) -5 o del(5q); -7; -17/abn (17p) Cariotipo complejo, cariotipo monosómico NPM1 no mutado y FLT3-ITD ^{high} RUNX1 o ASXL1 o TP53 mutado

Esta primera estratificación clasificaba a los pacientes con LMA en cuatro grupos de riesgo: favorable, intermedio (niveles I y II) y adverso (Dohner *et al.* 2010), estableciendo una relación entre la severidad del pronóstico y las características citogenéticas y moleculares de la LMA. Dicha revisión fue ampliamente aceptada y actualizada en el 2017 (Dohner *et al.* 2017) clasificando a los pacientes en tres grandes grupos de riesgo (favorable, intermedio, adverso) (Tabla I-6) con implicación pronóstica y terapéutica. La mayor disponibilidad de nuevas técnicas en el diagnóstico y seguimiento de la EMR, han permitido ampliar el conocimiento de las alteraciones moleculares en la LMA y la incorporación de nuevos fármacos en las estrategias de tratamiento, lo que ha propiciado realizar una nueva revisión y actualización tanto de la clasificación, como recomendaciones de tratamiento y seguimiento de la LMA por parte de la OMS (Khoury *et al.* 2022) y de la ELN (Dohner *et al.* 2022). Por ser nuestro proyecto de tesis anterior a estos cambios, no profundizamos más en las modificaciones que suponen esta nueva clasificación y basamos nuestro estudio en las anteriores versiones disponibles de ambas (Arber *et al.* 2016);(Dohner *et al.* 2017).

2.5. TRATAMIENTO DE LA LMA

2.5.1. Generalidades del tratamiento

El inicio de tratamiento puede ser urgente en determinados pacientes, como son aquellos con rápida proliferación de blastos (hiperleucocitosis) y/o síndrome de lisis tumoral o con coagulación intravascular diseminada asociada a la LMA, por la necesidad de controlar complicaciones con riesgo vital directamente relacionadas con la actividad de la enfermedad y que, a pesar del tratamiento de soporte que se establezca no se van a controlar hasta el inicio de la QT.

El tratamiento convencional con QT intensiva no ha variado en las últimas cinco décadas, si bien los resultados han mejorado debido a los progresos en el tratamiento de soporte y cuidados generales de los pacientes con LMA. El primer paso es valorar qué pacientes son candidatos a QT intensiva y, para ello, se debe determinar la mortalidad relacionada con el tratamiento. Aunque la edad es un factor importante, serán el “performance status” y las comorbilidades los factores que más pesen en la decisión. Además, en los pacientes mayores de 60 años, tiene mucho valor la caracterización genética de la LMA, ya que aquellos con riesgo adverso (Appelbaum *et al.* 2006; Dohner *et al.* 2017; Dohner *et al.* 2022), tienen mayor probabilidad de aparición de quimiorresistencia y la toxicidad y la alta mortalidad que implica la QT intensiva no compensa la probabilidad de alcanzar RC

Para los pacientes candidatos a QT intensiva, el tratamiento se divide en dos partes; una primera parte que es la administración de QT de inducción para alcanzar la remisión y una segunda parte que es el tratamiento post-remisión cuyo objetivo es la curación. Con la QT de inducción se pretende controlar y disminuir la carga tumoral, de tal forma que se alcance RC morfológica (definida como <5% blastos en MO) y que puede conseguirse tras 1 ó 2 ciclos de QT. Los pacientes que no alcancen RC tras 2 ciclos por definición y de acuerdo a los criterios de respuesta se catalogan como refractarios, es decir son pacientes quimioresistentes. Esta primera parte del tratamiento es importante porque aporta información sobre la tolerancia del paciente al tratamiento intensivo (y por lo tanto la probabilidad de tolerar el tratamiento post-remisión) y sobre la quimiosensibilidad de las células leucémicas.

El tratamiento post-remisión se decide en función de la edad y del potencial riesgo de recaída establecido según la estratificación del riesgo (ELN 2017/ELN2022 en la actualidad), así como la respuesta a la QT de inducción y la situación clínica del paciente. Así, los pacientes de riesgo intermedio/alto son candidatos a tratamiento post-remisión con Ato-TPH en primera RC y los pacientes riesgo favorable podrían alcanzar la curación sólo con QT (habitualmente 2-4 ciclos de citarabina en monoterapia en dosis intermedias/altas). En este subgrupo se incluyen pacientes con CBF-LMA [t(8;21); inv16; t(16;16)], LMA-NPM1 (en ausencia de mutaciones FLT3) y LMA con mutaciones localizadas en el marco de lectura de la región “zipper” *CEBPA*

(Wakita *et al.* 2022), en los cuales es fundamental una respuesta adecuada al tratamiento, es decir, deben alcanzar RC tras un primer ciclo de QT y/o RC y EMR negativa tras 2 ciclos, para continuar la consolidación con QT sin Alo-TPH, ya que la respuesta al tratamiento ha demostrado tener valor pronóstico, de tal forma que la persistencia de EMR positiva tras 2 ciclos aumentan el riesgo de recaída/progresión a pesar de las características biológicas iniciales de la LMA (Schuurhuis *et al.* 2018);(Jongen-Lavrencic *et al.* 2018);(Dohner *et al.* 2022).

2.5.2. QT de inducción

La QT de inducción, como se ha comentado en la introducción, se basa en la combinación de citarabina en infusión iv continua durante 7 días y una antraciclina (daunorrubicina, idarrubicina o mitoxantrona) iv durante 3 días, esquema “7+3” (Yates *et al.* 1973).

La citarabina es un análogo de nucleósido (análogo de pirimidina), fundamental en el tratamiento de la LMA. Tras la captación celular, es convertida en el metabolito activo en forma “trifosfato” = Ara-CTP (Figura I-1), que ejerce su actividad antileucémica inhibiendo la síntesis de ADN en las células en proliferación. Es un fármaco específico, que actúa en la fase “S” del ciclo celular.

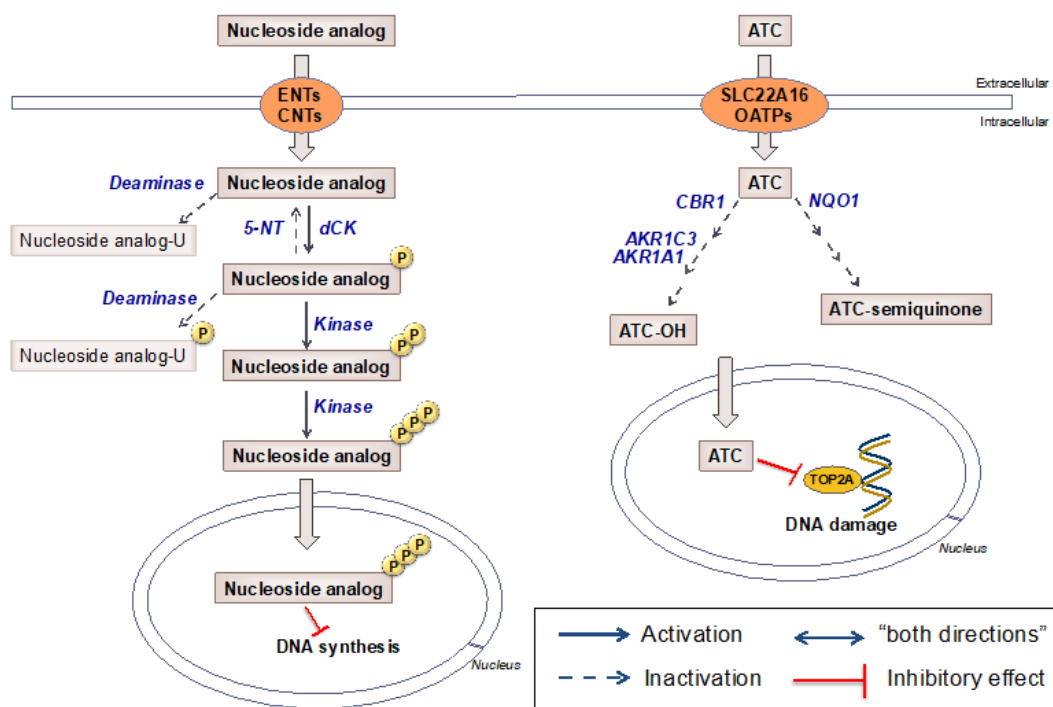


Figura I-1. Representación esquemática de la captación y metabolismo de los análogos de nucleósidos y antraciclinas. 5-NT, 5'-nucleotidasa; AKR, aldo-ketoreductasa; ATC, antraciclinas; CBR, carbonil reductasa; CNTs, transportadores concentrativos de nucleósidos; ENTs, transportadores equilibrativos de nucleósidos; NQO1, NADPH deshidrogenasa 1; OATPs, transportador de aniones orgánicos polipeptídicos; TOP, topoisomerasa. Modificado de (Marin *et al.* 2016).

La idarrubicina (Ida) es una antraciclina (antibiótico antitumoral derivado de la daunorrubicina) que inhibe la síntesis del ADN al intercalarse entre los pares de bases de ADN e inhibir la actividad de la topoisomerasa II (Figura I-1). También actúa mediante la producción de radicales libres y la interferencia con el ciclo celular en G2.

2.5.3. QT post-remisión

Desde finales de los 90, la administración de varios (3-4) ciclos de citarabina en dosis altas (HiDAC, del inglés “high doses Ara-C”) ha sido el tratamiento estándar post-remisión (o consolidación) para los pacientes candidatos a QT intensiva con riesgo bajo/intermedio, basado en el estudio del CALGB (Mayer *et al.* 1994) (Tabla I-7).

Tabla I-7. Algoritmo de tratamiento recomendado en pacientes con LMA candidatos a QT intensiva.

Candidatos a Quimioterapia (QT) intensiva		
Tratamiento de inducción: 7 + 3 (todas las edades)		
3 días de antraciclina iv (daunorrubicina al menos 60/mg/m ² /d; idarrubicina 12 mg/m ² /d; mitoxantrona 12 mg/m ² /d)		
7 días de infusión continua de citarabina iv (100-200 mg /m ² /d)		
Tratamiento post-Remisión		
Jóvenes 18-60/65 años		Mayores de 65 años
2-4 ciclos HiDAC	Favorable	2-3 ciclos IDAR (500-1000 mg/m ² /día) días 1,3,5
Alo-TPH 2-4 ciclos HiDAC HiDAC + Auto-TPH*	Intermedio	No está establecido el valor del tratamiento de la QT intensiva# Considerar Alo-TPH si el paciente tiene un bajo riesgo de HTC-comorbilidad
Alo-TPH	Adverso	

Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; d, día; HiDAC: dosis altas de Ara-C; HTC: comorbilidad trasplante hematopoyético; IDAR: dosis intermedias de Ara-C; iv, intravenoso; TPH: trasplante progenitores hematopoyéticos; *prácticamente en desuso. #En la actualidad otras opciones como el mantenimiento se pueden plantear cuando no sean candidatos a Alo-TPH. (adaptado de (Dohner *et al.* 2017)).

Cuando se habla de HiDAC, se hace referencia a la administración de 6 dosis de citarabina, 3 g/m² cada 12 horas iv en 2-3 horas, los días +1, +3 y +5, con una dosis total de 18 g/m²/ciclo. La principal limitación a estas dosis, es la neurotoxicidad, que puede ser grave especialmente en pacientes de mayor edad, en los que no se deben superar los 6-9 g/m² totales por ciclo.

Se han realizado múltiples estudios con distintas dosis y patrón temporal de administración de citarabina con el objetivo de optimizar las altas dosis del fármaco y disminuir sus efectos secundarios, en especial la neurotoxicidad, que puede ser severa hasta en un 12% de los casos con 3 g/m². Los estudios realizados por los grupos HOVON/SAKK, de Holanda y Alemania (Lowenberg *et al.* 2011), y por el grupo inglés MRC AML15 (Burnett *et al.* 2013) sugieren que dosis de 3 g/m² de citarabina no consiguen mejores resultados que dosis más bajas (1.5-2 g/m²). Por ello, las actuales guías de tratamiento aceptan dosis más bajas de citarabina como tratamiento post-remisión, con el objetivo de disminuir la toxicidad. De hecho, en los pacientes mayores de 60 años candidatos a QT intensiva no se recomienda superar los 6 g/m² totales por ciclo.

2.5.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

El Alo-TPH, en cualquiera de sus variedades, en función de la fuente de progenitores hematopoyéticos (MO, SP, sangre de cordón umbilical) y/o tipo de donante (familiar HLA-idéntico; donante no emparentado, haploidéntico) tiene una gran relevancia en el tratamiento de la LMA. Es considerado efectivo y la opción con más posibilidad de obtener curación, como tratamiento post-remisión en 1ª RC o posteriores, sin embargo la mortalidad relacionada con el trasplante puede comprometer su efecto beneficioso, por ello debe indicarse en pacientes con un alto riesgo de recaída, como son los pacientes con riesgo alto y/o intermedio según la clasificación de riesgo de la ELN2017 y cuya situación basal, comorbilidades cumplan los criterios establecidos para disminuir al máximo la mortalidad relacionada con el trasplante (Sorró *et al.* 2017). El efecto antileucémico ofrecido por el Alo-TPH (alo-reactividad=reactividad injerto contra leucemia) no ha sido superado hasta el momento por otro tratamiento una vez alcanzada la RC (Cornelissen *et al.* 2005). Las complicaciones secundarias al trasplante, en relación con la disparidad donante-receptor, edad y toxicidad de la QT y/o RT utilizadas como acondicionamiento para el trasplante, suponen un alto precio en términos de morbi-mortalidad y por ello el Alo-TPH produce sólo una mejora limitada en la supervivencia global a pesar de reducir el riesgo de recaída. Por lo tanto, es muy importante identificar a los pacientes con LMA que se pueden beneficiar del Alo-TPH.

2.5.5. Pacientes no candidatos a QT intensiva

Hasta hace pocos años, los pacientes no candidatos a QT intensiva pasaban a tratamiento de soporte, con hemoterapia, cobertura infecciosa y/o en aquellas LMA más proliferativas hidroxiurea o citarabina en dosis bajas (del inglés, “low doses ara-C”, LDAC) para controlar sintomatología asociada, lo que implicaba una supervivencia global de 3-6 meses. La introducción del uso de HMA, como la decitabina y la azacitidina (análogos de purina), nos permitió ofrecer tratamiento a este grupo de pacientes por su tolerancia, ventajas de administración ambulatoria, y aumento en la calidad de vida, pero con un bajo porcentaje de respuestas completas y corta duración de la respuesta (Tabla I-8). Afortunadamente, los

resultados de diferentes estudios combinando HMA con el inhibidor oral de Bcl2 (Venetoclax) han confirmado un beneficio tanto en el porcentaje, como en la duración de la respuesta de esta combinación que se ha convertido en el tratamiento estándar para los pacientes no candidatos a QT (tabla I-9) y se presta a combinaciones con nuevos agentes (inhibidores de FLT3, inmunoterapia...) que podrían claramente mejorar los resultados obtenidos hasta la fecha (Daver *et al.* 2020; DiNardo *et al.* 2020; DiNardo *et al.* 2020).

Tabla I-8. Algoritmo de tratamiento previamente recomendado en pacientes con LMA no candidatos a QT intensiva.

No candidatos a Quimioterapia intensiva	
Azacitidina	75 mg/m²/d/sc x 7 días cada 4 semanas hasta progresión
Decitabina	20 mg/m²/d/iv x 5 días cada 4 semanas hasta progresión
Citarabina (dosis bajas)	20 mg/12 h/sc x 10 días cada 4 semanas hasta progresión (No recomendado en pacientes con riesgo genético adverso)
Tratamiento soporte	Hidroxiurea para pacientes no candidatos a tratamiento o que no deseen tratamiento

iv, intravenoso; sc, subcutáneo. (adaptado de (Dohner *et al.* 2017)).

2.5.6. Nuevos tratamientos

Tras más de 40 años sin cambios relevantes, el panorama del tratamiento de la LMA está sufriendo cambios significativos con la aprobación en los 5 últimos años de nuevos fármacos por las agencias de regulación americana (FDA de “Food and Drug Administration”) y europea (EMA de “European Medicines Agency”), que han permitido incluso la incorporación a la práctica clínica asistencial de algunos de ellos (tabla I-9). Por ejemplo, el desarrollo de inhibidores de FLT3 o inhibidores de IDH1 y 2, han mostrado resultados positivos tanto en monoterapia como en combinación con QT. Así, por primera vez en años se han mejorado los resultados del esquema clásico de inducción 7 +3 en combinación con midostaurin en los pacientes con LMA con FLT3 mutado (Stone *et al.* 2017);(Schlenk *et al.* 2019) y se ha confirmado el beneficio del tratamiento de mantenimiento con sorafenib post-Alo-TPH (Garciaz *et al.* 2023). El futuro se dirige hacia un tratamiento individualizado en función de las características genéticas y condición clínica de los pacientes con LMA (Daver *et al.* 2020),(Dohner *et al.* 2022), (NCCN v3. 2022) con el continuo desarrollo de terapias dirigidas e inmunoterapia y la puesta en marcha de múltiples ensayos clínicos que prometen seguir cambiando los algoritmos de tratamiento y ampliar las opciones terapéuticas tanto de los pacientes candidatos a QT intensiva, como de no candidatos a QT intensiva y/o quimioresistentes. (Tabla I-9).

Tabla I-9: Nuevas terapias/combinaciones en LMA.

Población	Tratamiento	Mecanismo de acción	Estatus agencias
Adultos candidatos a quimioterapia (QT) intensiva			
Adultos candidatos a QT intensiva	7 + 3 (QT)	Citarabina: análogo de pirimidina Antraciclina: inhibidor de topoisomerasa II	Combinación en uso desde 1973
FLT3 mutado	"7 + 3" + Midostaurin	Inhibidor pan-kinasa (incluida FLT3) activo frente a mutación ITD y TKD	FDA 28 Abril 2017 EMA 20 Septiembre 2017
	"7 + 3" + Quizartinib	Inhibidor FLT3 tipo 2 de 2ª generación activo sólo frente a mutación ITD	FDA en revisión
FLT3 no mutado (CG NO adversa)	"7 + 3" +/- Gentuzumab Ozogamicin	Ac monoclonal anti-CD33 conjugado con "calicheamicin"	FDA 1 Septiembre 2017 EMA 4 Mayo 2018
t-LMA o LMA-MRC	CPX-351	Formulación liposomal de citarabina y Daunorrubicina 5:1 ratio molar	FDA 3 Agosto 2017 EMA 23 Agosto 2018
Adultos No candidatos a QT intensiva			
IDH1 mutado	Venetoclax* + HMA/LDAC	*Inhibidor Bcl2, apoptosis celular	FDA 21 Noviembre 2018 EMA 22 Abril 2021
	Glasdegib + LDAC	Inhibidor de ruta "Sonic Hedgehog"	FDA 21 Noviembre 2018
	Ivosidenib® + HMA	®Inhibidor IDH1	FDA 25 Mayo 2022
	Ivosidenib	Inhibidor IDH1	FDA 20 Julio 2018
IDH2 mutado	Enasidenib	Inhibidor IDH2	FDA 1 Agosto 2017
	Gilteritinib	Inhibidor FLT3 tipo 1 (activo mutación ITD y TKD) y AXL	FDA 28 Noviembre 2018 EMA 24 Octubre 2019
FLT3 mutado	Quizartinib	Inhibidor FLT3 tipo 2 (activo sólo en mutación ITD)	Aprobado en Japón
	Sorafenib	Inhibidor pan-kinasa, inhibidor FLT3 tipo 2 (activo sólo en mutación ITD)	FDA/EMA Ca. Renal, Hepatocarcinoma y Ca. Tiroides Uso en mantenimiento post-TPH
CD33 positivo (independiente del estatus IDH1/2 y FLT3)	Gentuzumab Ozogamicin	Ac monoclonal anti-CD33 conjugado con calicheamicin	FDA 1 Septiembre 2017 EMA 4 Mayo 2018

Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; CG, Citogenética; EMA, "European medicines agency"; FDA, "Food and drug administration"; FLT3, "Fms-tyrosine kinase gene"; HMA, agentes hipometilantes; IDH1/2, Isocitrato deshidrogenasa 1/2; ITD, "internal tandem duplication"; LDAC, Bajas dosis de citarabina; LMA-MRC, Leucemia Mielóide Aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; TKD, "tyrosin kinase domain, t-LMA, Leucemia mielóide aguda relacionada con tratamiento.

▪ Sorafenib

El sorafenib es un fármaco aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento del carcinoma renal, el carcinoma hepatocelular y el carcinoma de tiroides (Escudier *et al.* 2007);(Llovet *et al.* 2008);(Haugen *et al.* 2016) y ampliamente utilizado, a pesar de que aún no se ha aprobado su uso en el tratamiento de la LMA (múltiples ensayos clínicos y utilización fuera de indicación bajo petición). Es un compuesto que pertenece a la familia de inhibidores de receptores con actividad tirosina quinasa (TKIs). En el caso de muchos de estos receptores de la membrana plasmática (TKRs), su actividad tirosina quinasa es crucial por su participación en múltiples rutas de señalización celular implicadas en la evolución y progresión de diferentes neoplasias (incluida la LMA).

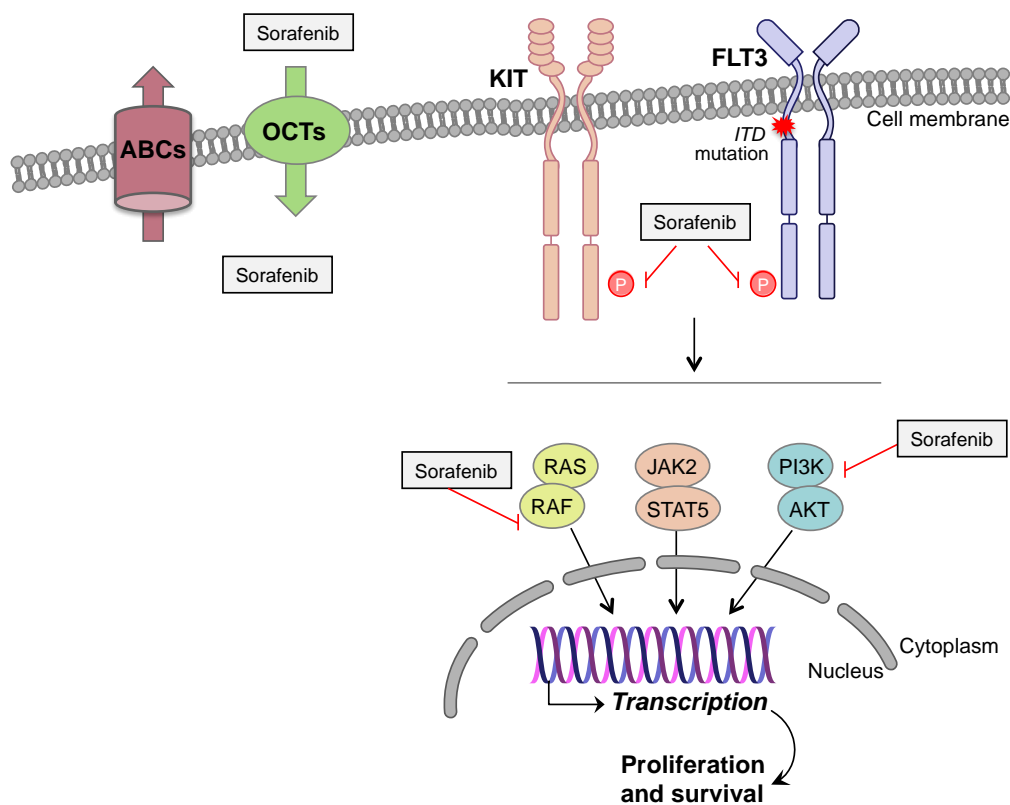


Figura I-2. Representación esquemática de los transportadores implicados en la captación (transportadores de cationes orgánicos, OCTs), y eflujo (“ATP-binding cassette proteins”, ABCs) de sorafenib, así como dianas moleculares presentes en las células de leucemia mieloide. Modificado de (Macías *et al.* 2018).

El sorafenib es capaz de unirse al receptor FLT3 (Figura I-2), además de a RAS/RAF, miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR y Kit) y del receptor 2 y 3 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). De particular interés son las mutaciones en el gen *FLT3*, como FLT3-ITD o D835 FLT3-TKD, que implican la sobre-expresión y activación constitutiva de esta quinasa y ocurre hasta en un 30% y en un 7-10%, respectivamente, de los pacientes con LMA (NCCN v2 2022). La presencia de mutaciones en FLT3, en especial las que afectan al dominio ITD está asociada

a un mal pronóstico, tanto por una mayor probabilidad de quimiorresistencia inicial, como por corta duración de la respuesta inicial y recaídas/progresión temprana tras el tratamiento.

El sorafenib y otros inhibidores de FLT3 han demostrado en múltiples estudios pre-clínicos y ensayos clínicos que pueden ser efectivos para el tratamiento de la LMA, especialmente aquellos con mutaciones de FLT3 que afectan a ITD, aunque no es activo en los pacientes con mutaciones en TKD. Los resultados iniciales han demostrado respuesta tanto en monoterapia, como en combinación con QT y en el mantenimiento post-Alo-TPH.

Desafortunadamente, la quimiorresistencia constituye también una de las principales limitaciones del éxito del tratamiento con sorafenib en LMA. Los mecanismos por los cuales se reduce la respuesta a este fármaco pueden ser múltiples y no todos bien conocidos. El transportoma definido como los transportadores de membrana expresados en cualquier momento de la vida del tumor, juega un papel clave en la captación y expulsión de fármacos y por lo tanto está directamente implicado en la cantidad de fármaco activo intracelular que actúe sobre su diana celular (Marin *et al.* 2016). OCT1 (gen *SLC22A1*) tiene un papel fundamental en la captación de sorafenib (Marin *et al.* 2016) y al menos en tumores sólidos, se ha descrito un descenso en la expresión de este transportador y la presencia de mutaciones inactivantes (Herraez *et al.* 2013). Otros mecanismos de quimiorresistencia que implican cambios en el transportoma como la sobre-expresión de múltiples bombas de expulsión pertenecientes a la superfamilia de proteínas “ATP binding cassette” (ABC), y la desregulación de transportadores de captación de la superfamilia de transportadores de solutos (SLC, del inglés “solute Carrier”) junto con la presencia de polimorfismos con pérdida de expresión se asocian con disminución de la sensibilidad al sorafenib en diferentes neoplasias (Shibayama *et al.* 2011);(Tomonari *et al.* 2016);(Marin *et al.* 2012);(Tandia *et al.* 2017).

2.6. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA EN LA LMA

2.6.1. Generalidades y clasificación

La “resistencia a múltiples fármacos” o fenotipo MDR, del inglés “multidrug resistance” es una característica común en células tumorales (Marin *et al.* 2016) y constituye un problema grave y frecuente en el tratamiento de los pacientes con LMA. A pesar de que hasta un 70-80% de los pacientes con LMA tratados con QT de inducción pueden alcanzar RC, un alto porcentaje de ellos recaen o progresan en 1 a 3 años, lo que implica una baja supervivencia a largo plazo. Así pues, la quimiorresistencia es uno de los factores responsables del mal pronóstico en pacientes con LMA. La quimiorresistencia puede ser primaria, cuando existe antes de la exposición a los fármacos o adquirida, cuando se desarrolla o aumenta durante la exposición

al tratamiento. En algunos casos, la presión farmacológica da lugar al desarrollo de resistencia cruzada con otros agentes, incluso sin que estén relacionados estructuralmente.

La importancia de los diferentes mecanismos de quimiorresistencia (MOCs, del inglés “mechanisms of chemoresistance”) en cada paciente y en cada momento (antes, durante y después del tratamiento o en la recaída) es una cuestión de gran relevancia y poco conocida. Se han descrito diversos MOCs que se han clasificado en varios tipos (Marin *et al.* 2016);(Briz *et al.* 2017) (Marin *et al.* 2020) y que se representan esquemáticamente en la Figura I-3.

- **MOC-1:** Se refiere a los mecanismos que promueven una disminución de la concentración intracelular de los fármacos, bien mediante la reducción de la captación de los fármacos (MOC-1a) o por un aumento de la expulsión de los mismos (MOC-1b).
- **MOC-2:** Incluye los mecanismos que disminuyen la proporción de fármaco activo en el interior de las células, bien porque reducen la actividad de las enzimas implicadas en la activación metabólica de profármacos, o bien porque aumentan la cantidad/actividad de las enzimas responsables de la inactivación de los agentes activos.
- **MOC-3:** Debidos a cambios en la expresión o mutaciones en las dianas moleculares de los fármacos, así como activación de vías de señalización o rutas metabólicas alternativas a las afectadas por el fármaco.
- **MOC-4:** Engloba los mecanismos que aumentan la capacidad de reparación del ADN en las células tumorales, lo que promueve la aparición de resistencia a los agentes antitumorales cuyo mecanismo de acción se basa en la alteración del ADN.
- **MOC-5:** Incluye los procesos que desregulan el balance apoptosis/supervivencia, tanto los que inducen la activación del crecimiento celular mediante la reducción de apoptosis (MOC-5a) o que estimulan la activación de las vías de supervivencia (MOC-5b).
- **MOC-6:** Debidos a cambios en el microambiente tumoral, entre los que se incluyen la hipoxia, la acidificación y la liberación de sustancias desde otras células vecinas, que pueden reducir la respuesta a la quimioterapia.
- **MOC-7:** Debidos a cambios fenotípicos entre tipos celulares, como la transición epitelio-mesenquimal (MET) o la aparición de rasgos característicos de células “stem”.

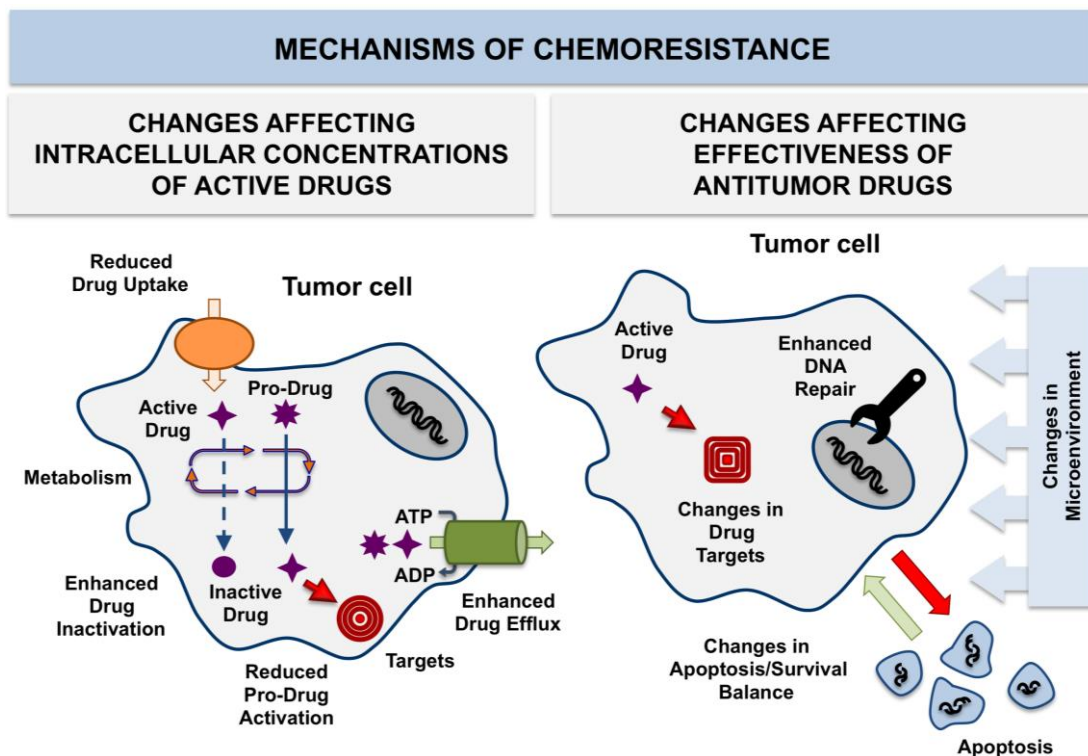


Figura I-3. Representación esquemática de los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) presentes en una célula tumoral: reducción de la concentración intracelular del agente antitumoral, por una disminución de la captación (MOC-1a) o un aumento de su expulsión (MOC-1b); alteraciones en el metabolismo de los fármacos, bien por una menor activación del profármaco o mayor metabolismo del agente activo (MOC-2); alteraciones en las dianas moleculares (MOC-3); cambios en el sistema de reparación del ADN (MOC-4); desregulación de las rutas que desencadenan la apoptosis o implicadas en la supervivencia celular (MOC-5); cambios en el microambiente tumoral (MOC-6); transición fenotípica entre tipos celulares (MOC-7) (Marin *et al.* 2016).

2.6.2. Transportadores de captación de fármacos: MOC-1a

La mayoría de los fármacos utilizados para en el tratamiento de los pacientes con LMA tienen sus dianas moleculares localizadas en el interior celular, por lo que para poder ejercer su acción deben entrar en las células atravesando la membrana plasmática. En solución acuosa, la mayoría de los fármacos están cargados eléctricamente y, por lo tanto, no son capaces de difundir libremente a través de la bicapa lipídica, sino que deben entrar en las células tumorales a través de proteínas transportadoras de membrana. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de proteínas de membrana "Solute Carrier" (SLC) que, en humanos, está formada por más de 400 miembros organizados en 65 familias.

Una disminución de la entrada de fármaco en la célula debido a la alteración de la función y/o expresión de los transportadores SLC responsables de su captación reduce la cantidad de fármaco activo en el interior celular, con la consecuente reducción de la respuesta a al tratamiento. Los transportadores de membrana más relevantes en la captación de fármacos administrados en el tratamiento de la LMA se presentan en la Tabla I-10.

Tabla I-10. Proteínas transportadoras y enzimas implicadas en quimiorresistencia en LMA. (Adaptado de (Marin *et al.* 2016)).

Grupo de Quimioterápico	Fármaco	Transportadores		Enzimas	
		Captación	Eflujo	Fase I (oxidación)	Fase II (conjugación)
Análogos de nucleósidos	Citarabina (ara-C)	ENT1	LRP, MRP8 Esperable: MRP4/5	dCK, CDA, 5-NT	
	Decitabina	ENT1		dCK, CDA, 5-NT	
	5-Azacitidina	ENT1		uCK, CDA	
	Fludarabina	ENT1, CNT3	BCRP		
Antraciclinas	Doxorrubicina	CNTs, SLC22A16	MDR1, ABCB2/5, MRP3, BCRP, ABCA2/3	CBR1/3, AKR1A1/C3	NQO1
	Daunorrubicina	CNTs	MDR1, ABCB2/5, MRP3, BCRP, ABCA2/3	Esperable: CBR1/3, AKR1A1/C3	Esperable: NQO1
	Idarrubicina	CNTs	MDR1	Esperable: CBR1/3, AKR1A1/C3	Esperable: NQO1
Podofilotoxinas	Etopósido (VP-16)	OCTN2	Esperable: MDR1, MRP2/3	CYP3A4, CYP3A5	UGT1A1, GSTP1, GSTM1
Inhibidores de tirosina kinasa	Sorafenib	OCT1	Esperable: BCRP	CYP3A4	UGT1A9
	Dasatinib	Esperable: OCT1	Esperable: MDR1	CYP3A4	Esperable: UGT1A9

▪ Análogos de nucleósidos

Los análogos de nucleósidos son agentes quimioterápicos ampliamente utilizados en el tratamiento de la LMA, destacando, entre otros los siguientes: citarabina, fludarabina, clofarabina, azacitidina, decitabina y cladribina. El transporte de estos fármacos al interior de las células leucémicas (blastos) se realiza fundamentalmente por medio de 2 familias de transportadores de nucleósidos: los transportadores concentrativos (CNTs) y los transportadores equilibrativos (ENTs). Entre todos ellos, se ha descrito que el ENT1 es el más abundante en blastos y en líneas celulares derivadas de LMA (Hummel-Eisenbeiss *et al.* 2013). Por ello, se considera al ENT1 el principal responsable de la captación de citarabina y de los inhibidores de metiltransferasa (5-azacitidina y decitabina).

Varios estudios han descrito que una reducción de los niveles de expresión de ENT1 se relaciona con la falta de respuesta de la LMA a los sustratos de ENT1. Así, se ha encontrado una disminución de la expresión de ENT1 en blastos de pacientes con LMA en recaída y en líneas celulares de LMA tras la exposición a decitabina (Qin *et al.* 2009), así como una tendencia a la disminución de los niveles de mRNA de ENT1 en blastos de pacientes con LMA en recaída cuando se comparan con los niveles determinados al diagnóstico y una menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con LMA con baja expresión de este transportador (Galmarini *et al.* 2002). Además, otro estudio describió que los niveles de expresión de mRNA de ENT1 se correlacionaban con la sensibilidad a la citarabina en blastos de niños con diagnóstico de LMA *de novo* (Hubeek *et al.* 2005).

Otros análogos de purinas también utilizados en el tratamiento de la LMA son fludarabina, clofarabina y cladribina. Experimentos *in vitro* han demostrado que estos compuestos son transportados por ENT1, ENT2 y CNT3 con diferentes afinidades (King *et al.* 2006). Así, en la leucemia linfática crónica (LLC) se ha descrito que la captación de fludarabina está mediada por ENTs (Molina-Arcas *et al.* 2003). Además, estudios *in vitro* en células humanas obtenidas del túbulo proximal renal demostraron que el CNT3 tiene un papel clave en la captación y citotoxicidad de la fludarabina (Elwi *et al.* 2009) y que el ATRA puede aumentar la captación de las células de LLC resistentes a fludarabina mediante la inducción del tráfico de vesículas que contienen CNT3 desde el compartimento intracelular hacia la membrana plasmática. Aunque los niveles de CNT3 en LMA son bajos, se desconoce si una caída de los niveles de este transportador puede asociarse a quimiorresistencia a la fludarabina.

▪ Aniones y cationes orgánicos

Varios transportadores de aniones o cationes orgánicos pueden estar implicados en el MOC-1a, ya que participan en la captación de fármacos utilizados en el tratamiento de pacientes con distintos tipos de leucemia, como el etopósido y los TKIs.

El transportador de cationes orgánicos/carnitina 2 (OCTN2, gen *SLC22A5*) es capaz de transportar etopósido y, en pacientes pediátricos con LMA, tratados con esquemas que incluyen etopósido, se ha podido demostrar que los niños eliminan elevados niveles de carnitina en orina por inhibición competitiva de la reabsorción tubular de carnitina, la cual es mediada por OCTN2.

El papel de los distintos transportadores en la captación de imatinib por las células mieloides no está bien caracterizado. El OATP1A2 (gen *SLCO1A2*) es capaz de transportar imatinib y se ha descrito que la presencia de algunos polimorfismos en OATP1A2 puede afectar a la farmacocinética de este TKI en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) (Yamakawa *et al.* 2011).

El imatinib también es transportado por el transportador de aniones orgánicos 1 (OCT1, gen *SLC22A1*), al igual que otros TKIs, como el sorafenib, utilizado en pacientes con carcinoma hepatocelular y carcinoma renal y que, actualmente, también se utiliza en pacientes con LMA. Se ha descrito que cambios en los niveles de OCT1 se relacionaban con la respuesta al imatinib en pacientes con LMC y se ha propuesto que la detección de los niveles de OCT1 podría ser útil para predecir la respuesta al tratamiento con TKIs (Wang *et al.* 2008). Los cambios en la funcionalidad de OCT1 también pueden afectar a la respuesta al imatinib.

El papel de OCT1 en el transporte de otras moléculas con actividad TK utilizadas en la LMA como dasatinib y sunitinib, así como de los nuevos inhibidores de FLT3 (midostaurina, quizartinib, gilteritinib, o crenolanib), no se conoce bien. Se ha demostrado que los niveles

intracelulares de dasatinib son mayores que los de imatinib en células con baja expresión de OCT1 (Giannoudis *et al.* 2008), por lo que el dasatinib podría ser una alternativa para los pacientes con bajos niveles de expresión de OCT1.

El sorafenib es un inhibidor multikinasa que también es sustrato de OCT1. Al menos en el carcinoma hepatocelular se ha observado que su efecto depende de la expresión y función de este transportador de las células tumorales (Herraez *et al.* 2013); ya que bajos niveles de OCT1 y/o la presencia de formas aberrantes se relacionan con quimiorresistencia. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado la contribución de OCT1 en la resistencia del sorafenib en la LMA.

2.6.3. Transportadores implicados en el eflujo de fármacos: MOC-1b

La quimiorresistencia de las células tumorales, incluidas las de LMA, puede deberse al aumento de la actividad de proteínas de membrana implicadas en la expulsión de xenobióticos, es decir, al aumento de la salida de agentes activos hacia el exterior de la célula mediante bombas de eflujo de la familia como ABC. La primera proteína de esta familia identificada fue la P-Glicoproteína o “multidrug resistance resistance protein” 1 (MDR1, gen *ABCB1*), cuya implicación en la quimiorresistencia en numerosos tumores, incluida la LMA, está ampliamente aceptado desde hace años (Efferth *et al.* 2001).

La bomba que confiere resistencia al cáncer de mama (BCRP de “breast cancer resistance protein”; gen *ABCG2*), pertenece a la familia G de proteínas ABC, y participa en la defensa frente a sustancias endógenas y xenobióticos en muchos tipos de células epiteliales y su sobre-expresión en células tumorales se asocia con quimiorresistencia (Noguchi *et al.* 2014).

Otras proteínas de esta superfamilia ABC, como las “multidrug-resistance associated proteins” (MRPs), contribuyen a la baja sensibilidad y/o respuesta a diversos fármacos mediante su expulsión fuera de la célula leucémica (Tabla I-10). Por lo tanto, la determinación de los niveles de expresión de bombas ABC en las células leucémicas puede proporcionar información sobre la falta de respuesta a la QT (Efferth *et al.* 2006). Un hallazgo interesante es la relación entre la expresión de determinados oncogenes y las proteínas ABC en varios tipos de tumores; así, en la LMC se ha visto que *cMYC* confiere un perfil transcripcional característico de bombas de expresión ABC en los progenitores hematopoyéticos (Porro *et al.* 2011). A continuación, se describe lo que se conoce del papel de las distintas bombas ABC en el eflujo de fármacos empleados en el tratamiento de la leucemia.

▪ Análogos de nucleósidos

Se ha propuesto que la MDR1 no confiere resistencia a los análogos de nucleósidos, como la fludarabina, lo que podría justificar la utilidad de esquemas basados en este fármaco, como su combinación con citarabina y G-CSF (FLAG) para superar la resistencia a las antraciclinas

cuando se expresan elevados niveles de MDR1 en las células leucémicas (Higashi *et al.* 2000)). Sin embargo, altos niveles de BCRP disminuyen la supervivencia libre de progresión y aumentan la tasa de recaída en pacientes con LMA que reciben QT de inducción con esquemas con fludarabina, lo que sugiere que la BCRP puede conferir resistencia a este fármaco (Damiani *et al.* 2010). Por el contrario, la citarabina no es transportada por BCRP, ni por MDR1 y, por lo tanto, estas proteínas ABC no juegan un papel importante en la resistencia a este fármaco en la LMA (Stam *et al.* 2004). Sin embargo, se ha descrito una menor supervivencia global en pacientes con LMA tratados con citarabina en pacientes que presentan niveles elevados de LPR o MVP (“lung resistance protein” o “major vault protein”, respectivamente) una proteína de resistencia que no pertenece a la superfamilia ABC y que actúa secuestrando al fármaco en lugar de expulsarlo de la célula (Filipits *et al.* 1998).

Las proteínas MRP4, MRP5 y MRP8 (genes *ABCC4*, *ABCC5* y *ABCC11*, respectivamente) se han asociado con el eflujo de nucleósidos endógenos y algunos fármacos derivados de nucleósidos, aunque existe cierta controversia sobre su participación en quimiorresistencia; elevados niveles de MRP8 en blastos de pacientes con LMA se han asociado con una baja supervivencia, por lo que se ha sugerido que la determinación de los niveles de MRP8 en blastos podría utilizarse como marcador para predecir la respuesta a citarabina en estos pacientes (Guo *et al.* 2009).

▪ **Antraciclinas**

El primer mecanismo de resistencia a antraciclinas caracterizado en células de LMA fue la sobre-expresión de MDR1, asociado con una disminución de la concentración intracelular y menor sensibilidad a este tipo de fármacos. Uno de los principales factores responsables de esta desregulación es la actividad de AML1-ETO, proteína de fusión que aumenta la capacidad de activar al gen *ABCB1*. La bomba MDR1 está implicada en el fenotipo MDR en la medida en que favorece la salida de diferentes compuestos de las células tumorales, con diferente estructura y mecanismos de acción (Marin 2012). Durante años los niveles de expresión elevados de MDR1 se han considerado como uno de los principales factores pronósticos desfavorables en la respuesta a la QT de inducción en pacientes con LMA tratados con regímenes basados en la administración de antraciclinas (daunorrubicina o idarrubicina) (Doxani *et al.* 2013);(Chauhan *et al.* 2012). Sin embargo, no siempre se ha encontrado una relación entre la sobre-expresión de MDR1 y el pronóstico desfavorable en cuanto a la respuesta a la QT, al menos en pacientes pediátricos con LMA (Steinbach *et al.* 2003), lo que quizás se deba a que la expresión de MDR1 en células leucémicas aumenta con la edad de los pacientes.

En pacientes de edad avanzada existe un aumento de la prevalencia de subpoblaciones con fenotipo CD34 comparado con células CD34- (Shman *et al.* 2008). En pacientes mayores con LMA que presentaban subpoblaciones con inmunofenotipo mielóide inmaduro con expresión

de CD34, MDR1 y BCRP se ha descrito una menor tasa de RC tras tratamientos basados en antraciclinas (van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2007).

A pesar de la importancia pronóstica de la expresión de MDR1 en la falta de respuesta de la LMA a las antraciclinas, no se ha encontrado que esta bomba esté desregulada en pacientes en recaída (van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2002). Hasta la fecha estudios realizados con inhibidores de MDR1 con el objetivo de revertir la quimiorresistencia secundaria a MDR1 no han aportado beneficios relevantes (Mahadevan *et al.* 2004).

La expresión de *ABCB5* ha sido propuesta como un prometedor marcador pronóstico de quimiorresistencia en LMA (Yang *et al.* 2012). En condiciones fisiológicas se expresa principalmente en piel sana, donde regula la “fusión” de progenitores de melanocitos. Esta bomba se encuentra expresada en melanoma y adenocarcinoma, donde podría estar implicada en la resistencia al 5-fluorouracilo (5-FU) y la doxorubicina (Frank *et al.* 2005). La expresión de *ABCB5* es más alta en células de LMA que en progenitores mieloides normales (Frank *et al.* 2005) y se ha visto que está más expresada en células de LMA con un fenotipo MDR y en pacientes con LMA con recaída tras tratamiento con tratamiento basado en daunorrubicina (Yang *et al.* 2012).

Varias MRPs se han asociados también con quimiorresistencia a antraciclinas en múltiples tumores. Así, se ha descrito un aumento de la expresión de MRP1 en una línea de LMA resistente a doxorubicina (Baran *et al.* 2007) y se ha propuesto como un factor pronóstico de quimiorresistencia en pacientes con LMA (Benderra *et al.* 2005).

Como ya se ha comentado, la sobre-expresión de BCRP se considera un problema importante, ya que se ha visto que esta bomba es capaz de expulsar de diversos agentes quimioterápicos en distintos tumores (Noguchi *et al.* 2014) y también se ha sugerido que juega un papel en la resistencia a las antraciclinas en LMA, por lo que su expresión en células leucémicas se ha propuesta como un factor pronóstico para alcanzar RC, supervivencia libre de progresión (4 años) y supervivencia global en pacientes tratados con daunorrubicina y mitoxantrona, pero no en los que reciben idarrubicina (Benderra *et al.* 2004).

Al contrario que MDR1 y MRP1, la expresión de BCRP se induce de forma significativa en respuesta al tratamiento (van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2002) y al igual que MDR1, BCRP se expresa mayoritariamente en subpoblaciones de LMA con fenotipo de “stem cell” (Suvannasankha *et al.* 2004). Elevados niveles de MDR1 y BCRP confieren a estas células mayor quimiorresistencia y, por lo tanto, contribuyen a la recaída.

La eliminación del agente quimioterápico del citoplasma por secuestro en compartimentos celulares es un mecanismo del fenotipo MDR que limita el tráfico entre compartimentos subcelulares, incluyendo el núcleo y previene la interacción del agente activo con el ADN. Los

lisosomas y endosomas son sitios posibles para acumulación de fármacos. Aunque esta variante de MOC-1b ha sido demostrada para daunorrubicina, posiblemente muchos otros fármacos pueden compartir este mecanismo de resistencia (Slapak *et al.* 1992);(Chapuy *et al.* 2008). Se ha encontrado una alta expresión de ABCA3 en la membrana de estos orgánulos en células de LMA, mientras que en progenitores hematopoyéticos normales apenas se detecta. La expresión de ABCA3 en líneas celulares implica una reducción significativa en la citotoxicidad tras la exposición a múltiples fármacos, incluida daunorrubicina.

Se considera que ABCA3 tiene relevancia clínica porque se ha demostrado relación entre altos niveles de expresión de ABCA3 y una menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global en niños con LMA (Steinbach *et al.* 2006). En pacientes con resistencia a antraciclinas se ha encontrado una elevada expresión de otras proteínas intracelulares, como ABCA2, ABCB2 y LRP (Bauer *et al.* 1998; Filipits *et al.* 1998).

▪ **Etopósido**

La sobreexpresión de MDR1, MRP2 y MRP3 se considera que tiene gran importancia en la refractariedad y desarrollo de resistencia a etopósido en distintos tumores (2010-Lagas-20028753). Cierta papel de estas bombas, además de la BCRP, se ha propuesto en la quimiorresistencia a etopósido en LMA, aunque éste aún no se ha demostrado (van der Kolk *et al.* 2002).

▪ **Inhibidores de tirosina kinasa**

Dada la capacidad de los transportadores ABC para exportar TKIs, como sorafenib o dasatinib entre otros, su sobre-expresión en células tumorales puede disminuir la eficacia de estos fármacos al reducir la cantidad de agente activo capaz de unirse a sus dianas terapéuticas en el interior celular. Se ha descrito que MDR1 transporta dasatinib y que BCRP puede restringir el acúmulo de sorafenib (Tang *et al.* 2013). Sin embargo, el impacto real de estos transportadores en la LMA todavía está por dilucidar.

2.6.4. Enzimas responsables del metabolismo de fármacos: MOC-2

Las enzimas que participan en el metabolismo de fármacos pueden jugar un papel clave en quimiorresistencia, ya que también pueden alterar la cantidad de fármaco activo en el interior celular. Algunos fármacos son administrados como pro-fármacos y necesitan ser biotransformados para poder ejercer su efecto citostático, por lo que cambios en los niveles de expresión de las enzimas responsables de la activación de pro-fármacos, así como de la inactivación de fármacos pueden afectar tanto a la respuesta, como a la toxicidad, que puede ser potenciada o reducida. Además, hay que tener en cuenta que muchos de los genes incluidos en el MOC-2 son altamente polimórficos y la presencia de variaciones genéticas

altera la actividad de estas enzimas. A continuación, se resume la información disponible hasta el momento para los diferentes tipos de fármacos utilizados en el tratamiento de la LMA.

▪ **Análogos de purinas:**

La citarabina y la decitabina, al igual que otros análogos de purinas, son compuestos, que requieren ser fosforilados para convertirse en su forma activa como “trifosfatos” (Figura I-1), y ejercer su efecto citotóxico. En este estado de trifosfato pueden incorporarse a la hebra del ADN e impedir su replicación (Grant 1998). Para convertirse en el metabolito activo, estos profármacos requieren la actividad de tres enzimas con actividad quinasa (Lamba 2009):

- Desoxicitidina quinasa (dCK)
- Desoxicitidina monofosfato quinasa
- Nucleósido difosfato quinasa

Por otro lado, se encuentran las enzimas con actividad desaminasa que evitan la generación de los metabolitos activos:

- Desaminasas de análogos de nucleósidos y derivados monofosfatos.
- “5-NT”: 5 nucleotidasa citosólica, que previene la formación de metabolito trifosfato activo.

Por lo tanto, la proporción de análogos de purinas farmacológicamente activos depende del balance entre los niveles de estas enzimas. Un aumento de la 5-NT o una disminución de la expresión de dCK en los blastos leucémicos puede afectar a la respuesta a estos fármacos y, por lo tanto, a los resultados clínicos (Galmarini *et al.* 2003).

Se ha descrito una correlación significativa entre la concentración intracelular de citarabina y la expresión del cociente dCK/5-NT mRNA y la sensibilidad a citarabina en los blastos de pacientes con LMA. Estos resultados se han observado también en líneas celulares como HL-60. También se ha demostrado una disminución del cociente dCK/5-NT y producción de citarabina-trifosfato en pacientes con LMA en recaída (Galmarini *et al.* 2004).

En líneas celulares se ha demostrado que una disminución de la expresión de dCK puede ser uno de los mecanismos de resistencia a decitabina debido a una menor incorporación de la forma activa de decitabina al ADN (Qin *et al.* 2009).

La sensibilidad a decitabina se correlaciona con la de citarabina, ya que ambas comparten la misma enzima para el primer paso de su biotransformación metabólica, pero no con la azacitidina, que utiliza la enzima uridina citidina quinasa, en lugar de dCK, para la primera fosforilación.

En pacientes con LMA se ha investigado la existencia de variantes genéticas implicadas en la formación de metabolitos activos de citarabina con objeto de determinar su utilidad como biomarcadores, para ayudar a los clínicos en las decisiones terapéuticas. Así, el análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNPs) en el gen *dCK* en líneas celulares expuestas a citarabina demostraron que la presencia de la variante p.Ile24Val;c.70A>G confiere a las células mayor sensibilidad al fármaco (Hartford *et al.* 2009). Igualmente, se han identificado variantes en el gen *CDA*; así, la variante *CDA**2 (p.lys27Gln; c79A>C) se ha asociado con una mayor mortalidad en niños tratados con citarabina (Bhatla *et al.* 2009) y, sin embargo, mayor citotoxicidad en adultos (Abraham *et al.* 2012). En un estudio sueco en pacientes con LMA *de novo* encontró una menor supervivencia global en individuos con las variantes c.79A>C y c.-451c>T del gen *CDA*. Este resultado fue peor en los pacientes FLT3 positivos (Falk *et al.* 2013). Por último, la variante c.7A>G en el gen *5-NT*, se ha relacionado con menor supervivencia global en pacientes FLT3 negativos. La relevancia de los polimorfismos de *dCK* y *CDA* y la asociación con los resultados en pacientes con LMA tratados con citarabina también ha sido descrita en otros trabajos (Falk *et al.* 2013).

▪ **Antraciclinas:**

Uno de los mecanismos de resistencia a antraciclinas es el aumento del metabolismo mediado por las enzimas detoxificantes carbonil-reductasa 1 (gen *CBR1*) y aldo/ceto reductasas (*AKR1A1*, *AKR1B1*, *AKR1B10*, *AKR1C3*), que llevan a cabo la transformación de grupos “aldehídos o cetónicos” en metabolitos hidroxilos menos potentes. La enzima AKR1C3 está sobre-expresada en múltiples tipos de neoplasias, incluida la LMA (Birtwistle *et al.* 2009) y se ha descrito que la inducción de AKR1C3 tras la exposición a antraciclinas puede potenciar resistencia intrínseca a estos fármacos (Hofman *et al.* 2014).

Aunque desde un punto de vista cuantitativo se considera menos relevante, las antraciclinas también son reducidas por oxidorreductasas, incluida la NAD(P)H dehidrogenasa-quinona 1 (*NQO1*) para formar un radical semiquinona. Estudios en pacientes con LMA tratados con esquemas con antraciclina y citarabina (con o sin etopósido) demostraron que los pacientes con polimorfismos en *NQO1**2 (que anulan la actividad de la enzima) tienen peor respuesta a la QT (Barragan *et al.* 2007).

▪ **Etopósido:**

El citocromo P-450 (CYP) incluye un grupo de enzimas que participan en el metabolismo de muchos compuestos y, en particular, la enzima CYP3A4 es la principal responsable de la O-desmetilación de epipodofilotoxinas, como el etopósido, en el metabolismo de catecol que podrá después ser oxidado a quinona por la mieloperoxidasa (MPO), enzima abundante en los progenitores hematopoyéticos. Ambos metabolitos actúan por unión a la topoisomerasa II. La inactivación del etopósido y sus metabolitos ocurre por conjugación con glucurónido,

principalmente catalizada por UGT1A1 y por conjugación con glutatión mediada por glutathione-S-transferasas (GSTs) (O'Brien *et al.* 2000). La disminución de GSTP1 o UGT1A1 y la presencia de polimorfismos se asocian con disminución o ausencia de actividad de la enzima confiriendo al tumor un fenotipo MDR, con disminución de la aclaración de VP-16 y por lo tanto mayor toxicidad.

- **Inhibidores de tirosina kinasa:**

La CYP3A4 también es la principal enzima responsable del metabolismo de los TKIs y, por lo tanto, afecta a la biodisponibilidad de estos fármacos. Participa en el metabolismo del sorafenib generando al menos 3 metabolitos: el N-óxido sorafenib; el N-hidroximetil sorafenib; y el N-desmetil sorafenib. El N-óxido es el más activo de los tres y los otros dos se ha visto que se eliminan rápidamente.

El sorafenib inhibe la enzima UGT1A1, afectando a la glucuronidación de la bilirrubina mediada por esta enzima. La presencia de polimorfismos en los genes de la familia UGT1A altera la farmacocinética de UG1A9, lo que afecta a la concentración de bilirrubina en suero. Sin embargo, el sorafenib y su metabolito N-óxido son metabolizados por UGT1A9 a metabolitos inactivos de la glucuronidasa. El sorafenib se tolera bien, pero los efectos secundarios severos en algunos pacientes y la falta de respuesta en otros obliga a suspender el tratamiento. Estas variaciones inter-individuales en la eficacia y toxicidad al sorafenib podrían relacionarse con las diferencias en el aclaramiento del fármaco debido a la distinta actividad de CYP3A4. Sin embargo, no hay estudios que relacionen los niveles de CYP3A4 y la respuesta y/o toxicidad del sorafenib.

Material y Métodos

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Pacientes y muestras

Se incluyeron en el estudio 75 pacientes con nuevo diagnóstico de LMA de 2 hospitales españoles: Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid y Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Para ello se utilizaron muestras procedentes del estudio de médula ósea realizado al diagnóstico de cada uno de los pacientes (excedente tras los estudios necesarios para la correcta asistencia clínica).

El tratamiento y seguimiento de los pacientes se realizó en cada uno de los hospitales por los médicos responsables del área. La selección de los pacientes, la recogida de las muestras y el acceso a las historias clínicas fueron realizadas por un médico especialista en Hematología en cada centro hospitalario.

El protocolo de investigación fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) de ambos centros hospitalarios, y se obtuvo el consentimiento informado y por escrito de los pacientes para el uso de las muestras en investigación biomédica, de acuerdo con las normas establecidas por dichos comités, siguiendo los acuerdos de la Declaración de Helsinki de 1975. Los datos personales, analíticos y clínicos derivados del estudio han sido tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la ley 15/99 (RD 994/99).

Criterios de inclusión

Pacientes con nuevo diagnóstico de LMA con las siguientes características:

- Disponibilidad de muestra de blastos obtenidos de MO en el momento del diagnóstico y tras cada uno de los ciclos de inducción 1 y 2, para extracción de ARN.
- Tratamiento inicial con QT de inducción 7+3 (citarabina 100-200 mg/m² en infusión i.v. continua durante 7 días e idarrubicina 12 mg/m² i.v. durante los 3 primeros días). Segundo ciclo igual o con dosis intermedias de citarabina administrada en 2-3 horas i.v. (Figura MM-1).
- Seguimiento de los pacientes e información clínica disponible de la respuesta con estudio de MO tras cada uno de los 2 ciclos de QT (Figura MM-1)

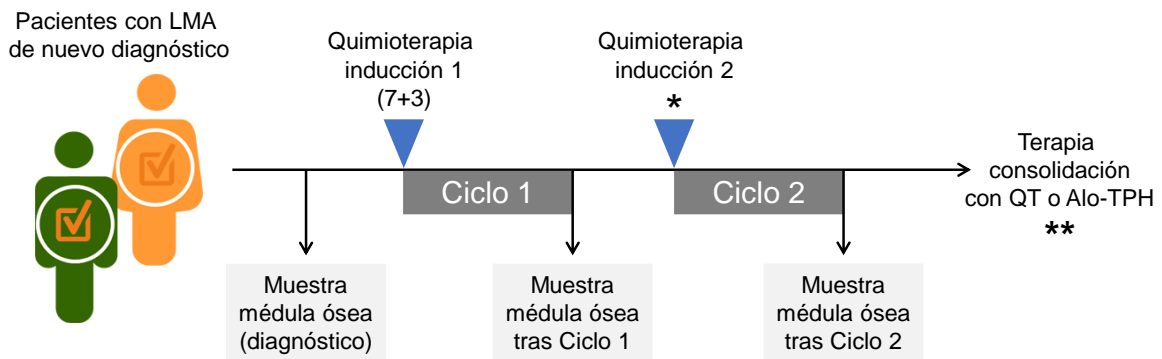


Figura MM-1. Esquema del tratamiento de los pacientes incluidos en el estudio. (*) QT de inducción 2 con un segundo ciclo igual o con citarabina a dosis intermedias en 2-3 horas iv. MO, médula ósea. (**) Alo-TPH, trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos o QT en función de la edad y del potencial riesgo de recaída.

Criterios de exclusión

- Tratamiento de inducción diferente del clásico 7+3 (citarabina + idarrubicina).
- Muestra insuficiente de ARN extraído de los blastos obtenidos al diagnóstico.
- Muerte temprana de los pacientes (antes de 45 días tras el inicio del tratamiento) que impedía la evaluación de la respuesta al tratamiento.

Los valores de las pruebas clínicas y de laboratorio se obtuvieron de las historias clínicas. La respuesta a la quimioterapia de inducción se evaluó según los criterios revisados de Cheson (Cheson *et al.* 2003). La RC se definió como blastos de médula ósea <5%, independencia de transfusiones, recuento de neutrófilos $>1 \times 10^9/L$ y recuento de plaquetas $>100 \times 10^9/L$. Cuando sólo se cumplían los dos primeros requisitos, se consideraba RC con recuperación incompleta (RCi). Los pacientes se clasificaron como respondedores (R) si lograban RC o RCi tras dos ciclos. Los pacientes que fallecieron durante la inducción antes de la evaluación de la respuesta se consideraron no evaluables. Los demás pacientes se clasificaron como no respondedores (NR).

La figura MM-2 muestra el “flow-chart” de pacientes incluidos en el estudio que cumplían todos los criterios de los inicialmente seleccionados (n = 75) y los casos excluidos.

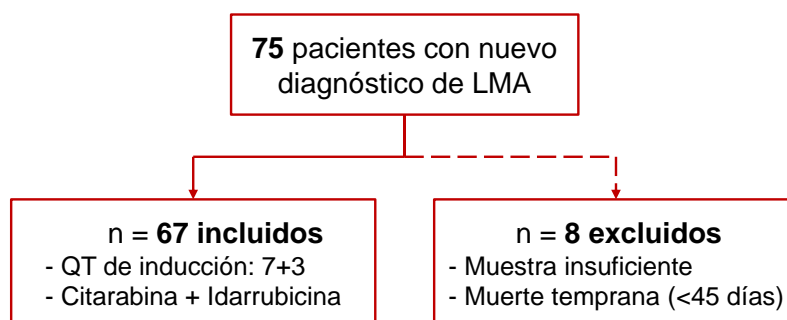


Figura MM-2. Distribución de los pacientes con LMA atendidos en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (n = 39) y el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (n = 28) seleccionados inicialmente para el estudio. La flecha discontinua indica los pacientes excluidos.

Obtención de blastos

Las muestras de médula ósea en heparina se procesaron con el fin de obtener las poblaciones de células mononucleadas siguiendo una metodología estándar tras separación por gradiente de densidad utilizando el polisacárido hidrofílico *Ficoll-Paque™ PLUS*. La muestra se diluyó con “Hanks´ Balanced Salt Solution” (HBSS) 1:3 y se depositó sobre el Ficoll con la precaución de evitar la mezcla de ambas fases. A continuación, se centrifugó a 400 xg durante 25 min para obtener, según su densidad, las diferentes capas celulares (Figura MM-3). Posteriormente, se recogió la interfase que contenía la población de blastos y tras un lavado con HBSS se realizó el recuento de células separando una alícuota para su procesamiento y extracción del ARN.

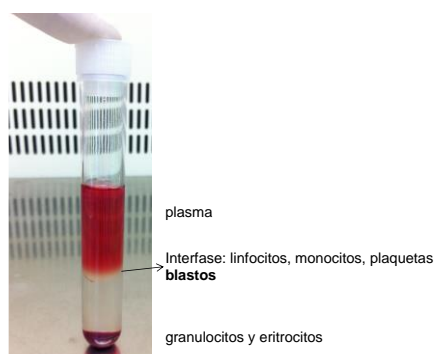


Figura MM-3. Imagen representativa de la separación de plasma y diferentes poblaciones celulares de una muestra de médula ósea por gradiente de densidad con Ficoll-HBSS.

3.1.2. Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana: HL-60, MOLM-13, HEL y OCI-AML2, derivadas de LMA, y K-562, derivada de una leucemia mieloide crónica (LMC) en crisis blástica, razón por la cual se considera un tipo de leucemia aguda y, de hecho, se ha utilizado ampliamente en estudios de LMA (Cristobal *et al.* 2011; Lalic *et al.* 2012). Todas ellas procedían de la “American Type Culture Collection” (ATCC) (LGC Standards, Barcelona) o de la “German Collection of Microorganisms and Cell Cultures” (DSMZ).

En la tabla MM-1 se representan las características principales de cada línea celular según las clasificaciones franco-américo-británica (FAB) y de la Organización Mundial de la Salud (WHO), así como las mutaciones más relevantes que presentan.

Tabla MM-1. Características de las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda (LMA) y de la línea K-562.

Línea celular	FAB	WHO	LMA	Mutaciones
MOLM-13	M5	Leucemia monocítica	sLMA	<i>FLT3 ITD</i>
OCI-AML2	M4	Leucemia monocítica	<i>de novo</i>	<i>DNMT3A</i>
HL-60	M2	LMA con maduración	<i>de novo</i>	
HEL	M6	Leucemia eritroide	sLMA	<i>JAK2</i>
K-562	<i>Leucemia mieloide crónica en crisis blástica</i>			

FAB, sistema de clasificación Franco-Ámerico-Británico; sLMA, LMA secundaria; WHO, sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

Adicionalmente, la línea celular HepG2 (HB-8065) de hepatoblastoma establemente transducidas con lentivirus que portaban OCT1 fue utilizada como control positivo para los estudios de funcionalidad de OCT1.

3.2. MATERIAL

3.2.1. Productos

Los productos utilizados en esta Tesis Doctoral se adquirieron en las siguientes casas comerciales:

- Air Liquide (Valladolid): CO₂ y N₂ líquido.
- BD Biosciences (Madrid): fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo.
- Biomers.net (Donau, Alemania): oligonucleótidos cebadores o “primers”.
- GE HealthCare (Thermo Fisher Scientific, Madrid): Ficoll-PaqueTM Plus y kit “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”.
- Lonza: “Hanks´ Balanced Salt Solution” (HBSS 1x).
- MerckMillipore (Sigma-Aldrich): filtros “SteritopTM” para la esterilización de medios de cultivo.
- Sigma-Aldrich (Madrid): azul de Tripán, bicarbonato sódico, carboxifluoresceína diacetato, clorhidrato de doxorubicina, D-glucosa, diclofenaco, dietilpirocarbonato (DEPC), dihidroetidio, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), fumitremorgina C (FTC), yoduro de propidio (IP), isotiocianato de fluoresceína (FITC),

bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), probenecid, rodamina 123, Tris (trishidroximetil aminometano) base (Trizma) o clorhidrato (Tris-HCl), verapamilo, yoduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina, p-acetamidofenol β -D-glucurónido, ácido tauroquenosodesoxicólico (TCDCA), guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (2-cloro-MP), quinina, amantadina, metformina, xantina, niacinamida, espermidina, betaína, dopamina.

- Thermo Fisher Scientific (Madrid): BODIPY-prazosina, calceína acetoximetil éster (calceína-AM), HEPES, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina), suplemento GlutaMAX derivado de glutamina, kits comerciales para la transcripción reversa (RT) "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit", medios de cultivo α -MEM y RPMI 1640, suero bovino fetal (FBS), "SYBR Green I PCR Master Mix".
- VWR Internacional: ácido clorhídrico, cloruro cálcico, cloruro potásico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, fosfato ácido potásico, etanol (grado analítico), sulfato de magnesio.
- El tosilato de sorafenib (Nexavar®), la idarrubicina (Zavedos®) y la citarabina (Pfizer) fueron proporcionados por el Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

3.2.2. Medios instrumentales

- Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid).
- Para la determinación del pH se utilizó un electrodo micro pH 2002 (Crison, Barcelona).
- El agua destilada y ultrapura se obtuvieron mediante un equipo de filtración MilliQ Integral 3 (Merck-Millipore).
- Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Merck-Millipore). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper).
- El manejo de cultivos celulares se realizó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona) o modelo Telstar Bio-IIA (Telstar). Las células se mantenían a 37°C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher). Para el cultivo de las líneas celulares se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos (TTP, Prosisa) 24 y 6 pocillos, placas circulares de 10 cm de diámetro, así como frascos de cultivo de 25 y 75 cm² de Corning (Thermo Fisher). Para el conteo de las células se utilizaron cámaras Neubauer y para su visualización se utilizó un microscopio de contraste de fases (Nikon, Duerolab, Salamanca).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman Avanti J-20 (Beckman Instruments, Madrid) y las de tubos eppendorf se llevaron a cabo en centrífugas

Eppendorf modelos 5417R y 5810R (Hucoa-Erlöss, Madrid) y en una picofuga Stratagene® VWR International (Eurolab S.L., Barcelona).

- Las incubaciones y calentamiento de muestras se llevaron a cabo en baños termostatzados tipo “fuera borda” marca Selecta modelo Unitronic-320 (Pacisa+Giralt, Madrid).
- Las muestras de RNA y proteínas se conservaron en un congelador -80 °C marca Revco (Thermo Fisher). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N₂ líquido (Thermo Fisher).
- Las determinaciones espectrofotométricas de la concentración de ARN se realizaron con un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher). Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó un lector de ELISA modelo Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher).
- La fluorescencia celular se midió mediante citometría de flujo con un modelo FACScalibur (BD Biosciences), Para la RT se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycle ep gradient (Thermo Fisher). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un aparato ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.
- La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplado a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid). Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid).
- Además, se contó con un pequeño equipamiento como agitadores magnéticos Selecta (DureoLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, Estados Unidos) y micropipetas Gilson (Prosisa).
- El material de vidrio utilizado procedía de Afora (Madrid) y para su uso en biología molecular se trataba mediante calor seco durante 4 h en una estufa a 180 °C, modelo S-20 (Selecta).

3.3. CULTIVOS CELULARES

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 con un 10% de suero bovino fetal inactivado a 56 °C durante 30 min, excepto las células OCI-AML2, que se cultivaron con medio α -MEM y un 20% de suero bovino fetal. En ambos casos, los medios se suplementaron con un 1% de una mezcla de antibióticos que contiene penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 0,1 mg/ml.

Para descongelar las células almacenadas en N₂, los criotubos que las contenían se introdujeron en un baño húmedo termostatzado a 37°C. Una vez descongeladas, las células se centrifugaron 300 xg durante 5 min y el precipitado se sembró en un frasco de cultivo.

3.3.1. Determinación de la viabilidad celular

Para determinar el efecto citostático de citarabina, idarrubicina y sorafenib en las distintas líneas celulares se utilizó el test de formazán-MTT, un método colorimétrico que cuantifica el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular, que se basa en la reducción de las sales de tetrazolio (MTT) a cristales de formazán por la acción de deshidrogenasas mitocondriales sólo presentes en las células metabólicamente activas. De tal forma que la cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad de 5.000 ó 10.000 células por pocillo, y tras 24 horas se expusieron a concentraciones crecientes de los fármacos. A las 72 h de incubación, se añadió a cada pocillo 10 µl de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), de color amarillo y se mantuvieron en la estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 4 h. Los cristales de formazán de color púrpura que se formaron se solubilizaron en 100 µl de SDS al 10% en HCl 0,01 M. La absorbancia se midió en lector de microplacas a 595 nm. La concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular en un 50% (IC₅₀) se calculó a partir de las curvas dosis-respuesta.

Tanto los ensayos con diferentes concentraciones de los fármacos como los controles (células no tratadas) se realizaron por triplicado.

3.3.2. Evaluación de la apoptosis/necrosis

La apoptosis se determinó mediante el kit de detección de apoptosis Anexina V-PE/7 amino-actinomicina D (7-AAD) de BD Pharmingen. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con gran afinidad por la fosfatidilserina, fosfolípido que se encuentra normalmente en la capa interna de la membrana plasmática en células vivas. En las células apoptóticas, la fosfatidilserina se transloca a la capa externa y queda expuesta en la superficie celular, permitiendo que la Anexina V identifique las células apoptóticas uniéndose a ella. En este kit, esta proteína está conjugada con ficoeritrina (PE), y se utiliza junto con 7-AAD, un colorante de unión a ADN que permite visualizar las células necróticas y las células en apoptosis tardía, en las que ya se ha perdido la integridad de la membrana. Tras la incubación de las muestras con Anexina V-PE junto con 7-AAD, se pueden identificar, mediante citometría de flujo, poblaciones celulares diferentes; células viables (Anexina V-PE negativo/7-AAD negativo), células en apoptosis temprana y tardía (Anexina V-PE positivo/7-AAD negativo y Anexina V-PE positivo/7-AAD positivo, respectivamente) y células necróticas (Anexina V-PE negativo/7-AAD positivo) (Figura MM-4).

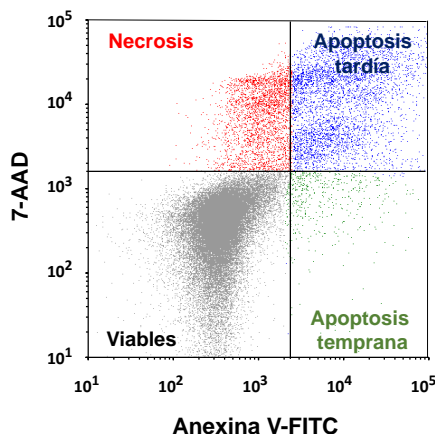


Figura MM-4. Representación en gráficas de puntos de las poblaciones celulares que se observan por citometría de flujo tras la tinción con Anexina V-FITC y 7-AAD. La figura muestra las siguientes poblaciones celulares: células viables (abajo izquierda), células en apoptosis temprana (abajo derecha), células necróticas (arriba izquierda) y células en apoptosis tardía (arriba derecha).

Las células fueron sembradas en placas de 48 pocillos, a una densidad de 200.000 ó 250.000 células por pocillo, y se expusieron a concentraciones crecientes de sorafenib. A las 72 h de incubación, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en un tampón de unión (diluido 1:10 en PBS). Se añadieron 5 μ l de Anexina V-PE y 5 μ l de 7-AAD y se incubaron durante 15 min en oscuridad. Para cada condición, se recogieron y analizaron 50.000 eventos (células) por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca).

3.4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA

La determinación de los niveles de expresión de genes se realizó por PCR cuantitativa a tiempo real (una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis *et al.* 1986)), donde la cantidad de producto sintetizado en cada ciclo de PCR es detectada mediante el uso del fluorocromo “SYBR Green I” (componente de la mezcla de reacción “SYBR Green PCR Master Mix”), siendo la fluorescencia emitida proporcional a la cantidad de ADN amplificado.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml/pocillo a una densidad celular adecuada en función de la línea celular y en ausencia o presencia del fármaco de interés a una concentración próxima a la IC₅₀. Tras el tiempo adecuado para cada experimento, las células se recogían y se procesaban para la obtención de ARN total.

3.4.1. Extracción de ARN total

Para extraer el ARN total a partir de extractos celulares o de blastos se utilizó el kit comercial “illustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare), según las instrucciones del

proveedor. Se utilizaron aproximadamente 5×10^6 células. El ARN total purificado fue cuantificado mediante un Nanodrop a una longitud de onda de 260 nm.

3.4.2. Transcripción reversa (RT)

El ADN complementario (ADNc) utilizado como molde en la PCR se obtuvo a partir de 2 µg de ARN total mediante una reacción RT utilizando la mezcla de reactivos “High-Capacity cDNA Reverse Transcription”, que contiene la transcriptasa reversa recombinante y optimizada del virus de la leucemia murina de Moloney, una solución tampón de la reacción, dNTPs y una mezcla de “random primers”. Tras añadir el ARN a la mezcla, la reacción se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones de incubación: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y un paso final de 5 min a 85 °C para la inactivación de la enzima. El producto de la reacción se diluyó 1/5.

3.4.3. Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para cada uno de los genes analizados en este trabajo se diseñaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, Estados Unidos). Su especificidad se comprobó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los cebadores se diseñaron situándolos entre dos exones codificantes utilizando como molde la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen. La tabla MM-2 recoge las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia de ARNm de las proteínas estudiadas en este trabajo. Los cebadores fueron suministrados liofilizados por la casa comercial. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua ultrapura y se valoraron por Nanodrop a una longitud de onda de 260 nm.

Tabla MM-2. Cebadores o “primers” utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes por RT-PCR cuantitativa.

Proteína/Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	Número de acceso
ENT1 (<i>SLC29A1</i>)	CCATCGATCTGGAGCCCGT	TGTCATGGTGATGGTGTCTCGGT	178	NM_001078177
ENT2 (<i>SLC29A2</i>)	CCGCCATCCCGTACTTCCA	TGTTGAAGTTGAAGGCATCCTCGG	105	NM_001532
CNT1 (<i>SLC28A1</i>)	GCTCTGCACTGGGCTCTCT	TTGAGAAACCTCCTCAGCTTTGGC	156	NM_004213
CNT2 (<i>SLC28A2</i>)	GGGCTGGAGCTCATGGAAAAAGAA	CCACCGACTCCTCCTCTGGTAA	117	NM_004212.3
CNT3 (<i>SLC28A3</i>)	GGTTCTGGCTGAAGTGGGTGAT	ACATTATGAGCCACCGAAGGACA	120	NM_022127
OCT1 (<i>SLC22A1</i>)	TGCAGACAGGTTTGCCCGT	GCCCCAGCCAACAAATTCTGTGAT	187	NM_003057
OCT2 (<i>SLC22A2</i>)	CCCTTCAGCGCCTGAGACTT	TCACCTGCAAGGCCCATGT	177	NM_003058
OATP1A2 (<i>SLCO1A2</i>)	AAGACCAACGCAGGATCCAT	GAGTTTCACCCATTCACCGTACA	101	NM_021094
OCTN2 (<i>SLC22A5</i>)	ACCATTGTGACCGAGTGGAACCT	CAACAGCACACCCACGAAGAACA	87	NM_003060
MDR1 (<i>ABCB1</i>)	GCGCGAGGTCGGAATGGAT	CCATGGATGATGGCAGCCAAAGTT	198	NM_000927
BCRP (<i>ABCG2</i>)	CCCAGGCCTCTATAGCTCAGATCATT	CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	161	NM_004827
MRP1 (<i>ABCC1</i>)	CCGCTCTGGGACTGGAATGT	GTGTCATCTGAATGTAGCCTCGGT	215	NM_004996
MRP2 (<i>ABCC2</i>)	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	171	NM_000392
MRP3 (<i>ABCC3</i>)	CCAAGTTCTGGGACTCCAACCTG	ATGATGTAGCCACGACAATGGTGC	160	NM_003786
MRP4 (<i>ABCC4</i>)	TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA	CTTTGGCACTTTCCTCAATTAACG	141	NM_005845
MRP5 (<i>ABCC5</i>)	GTTCAGGAGAACTCGACCGTTGG	TTTGGAAAGTAGTCCGGATGGGCTT	178	NM_005688
MRP8 (<i>ABCC8</i>)	CGGTCTCCTTTATTCTCCACA	AGCCTCTTAAACTGGCTGATGAAGT	101	NM_032583
LRP (<i>MVP</i>)	GCAGGACAATGAGAGGGTACTGTTT	CCGAACCTGCCCTGTGACATCAA	136	NM_017458
CDA (<i>CDA</i>)	GCTATCGCCAGTGACATGCAAGA	AGTTGGTGCCAAACTCTCTCATGACT	82	NM_001785
dCK (<i>DCK</i>)	GGGAACATCGCTGCAGGGAA	ACAGGTTTCAGGAACCACTTCCCA	83	NM_000788
5-NT (<i>NT5C2</i>)	AGAAGCCTATCATCGGGTGTGTAAG	CATACTCTGGGGACTTGTACACAGCAA	110	NM_012229
GAPDH (<i>GAPDH</i>)	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAATCCGTTGACTCC	138	NM_002046

3.4.4. Realización de la PCR cuantitativa

En todos los casos se utilizaron las mismas condiciones de temperatura para la PCR. Primero se incubaron las muestras 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C y, finalmente, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y de 1 min a 60 °C.

La abundancia del ADN problema se expresó como porcentaje de la abundancia del normalizador GADPH, determinado paralelamente en cada muestra. Todas las determinaciones se realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos con agua ultrapura en lugar de ADNc.

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación del ciclo umbral o Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que, la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno resulta un valor de Ct normalizado del gen diana.

3.5. ESTUDIOS DE TRANSPORTE

La evaluación de la funcionalidad de proteínas transportadoras de la familia ABC y el transportador OCT1 se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizaron sustratos fluorescentes típicos e inhibidores de su actividad para cada uno de los transportadores a

estudiar (tabla MM-3). Estos sustratos se acumulan en el interior de la célula dependiendo de la actividad de estas proteínas y de la presencia o no del inhibidor.

Tabla MM-3. Sustratos fluorescentes e inhibidores específicos de los transportadores utilizados para determinar su actividad por citometría de flujo.

Proteínas	Sustratos fluorescentes
MDR1	Rodamina 123 / Yoduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina
MRP1/2	Calceína*
MRP3/4/5	Carboxifluoresceína (CF)*
BCRP	BODIPY-prazosina
OCT1	Dihidroetidio (DHE)
Proteínas	Inhibidores
MDR1	Verapamilo
MRP1/2	Probenecid
MRP3	p-acetamidofenol β -D-glucurónido (APAP-gluc)
MRP3/4	Ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA)
MRP3/4/5	Probenecid, Diclofenaco
MRP5	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP)
BCRP	Fumitremorgina C (FTC)
OCT1	Yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (2-cloro-MP)

BCRP, breast cancer resistance protein; MDR1, multidrug resistance 1; MRP, multidrug resistance-associated protein; OCT1, organic cation transporter 1.

(*) La calceína y la carboxifluoresceína fueron añadidas al medio de captación como ésteres no fluorescentes.

Procedimiento:

Las células procesadas se lavaron con PBS, se centrifugaron a 300 xg durante 5 min y el precipitado de células se resuspendió en medio de captación (NaCl 96 mM; KCl 5,3 mM; KH₂PO₄ 1,1 mM; MgSO₄ 0,8 mM; CaCl₂ 1,8 mM; D-glucosa 11 mM y Hepes/Tris 50 mM; pH 7,4). Tras el procesamiento de las células se realizaron 2 tipos de experimentos:

3.5.1. Experimentos de captación para el estudio de OCT1

La suspensión celular se incubó a 37°C en oscuridad con una solución de sustrato que contenía o no el inhibidor específico para el transportador durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se paró la captación añadiendo 900 μ l de medio de captación enfriado en hielo y se midió la fluorescencia de las células por citometría de flujo.

3.5.2. Experimentos de eflujo para el estudio de proteínas ABC

La suspensión celular se incubó con una solución de sustrato durante 30 min a 37°C en oscuridad. Posteriormente, se añadió un volumen de 900 µl de medio de captación que contenía o no el inhibidor específico para cada transportador, e inmediatamente se midió la fluorescencia de las células en el citómetro de flujo para determinar la carga inicial. Las células fueron incubadas en esta solución durante 30 min a 37°C, analizándose la fluorescencia al cabo de ese tiempo. La cantidad del compuesto expulsado se calculó por la diferencia entre el contenido celular tras 30 min de flujo y la carga inicial.

Las concentraciones de los sustratos e inhibidores (Tabla MM-3), así como los tiempos de incubación en ambos tipos de experimentos se determinaron en ensayos previos de puesta a punto realizados en nuestro laboratorio (Al-Abdulla *et al.* 2019; Di Giacomo *et al.* 2019).

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para describir las variables continuas se utilizaron la media y el error estándar o la mediana y el intervalo. Para comparar grupos (emparejados o no emparejados) se utilizaron pruebas t de Student independientes de dos colas o pruebas H de Kruskal-Wallis. Las variables categóricas se sometieron a la prueba Chi-cuadrado. Los valores P no ajustados inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se realizó un análisis de la curva "Receiver Operating Characteristic" (ROC) para evaluar la capacidad de discriminación de las variables. El rendimiento se obtuvo en términos de área bajo la curva (AUC) utilizando el software R v4.0.3 (paquetes: 'ROCR' v1.0-11; 'pROC' v1.17.0.1). El análisis multivariante, incluido el análisis de componentes principales (ACP), también se realizó con R.

Resultados y discusión

**4.2. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS
TRANSPORTADORAS DE MEMBRANA EN LA
SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA AL SORAFENIB**

4.2. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE MEMBRANA EN LA SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LMA AL SORAFENIB

En los últimos 5-10 años se han desarrollado múltiples terapias vectorizadas para el tratamiento de la LMA, con estudios en monoterapia y/o en combinación con QT convencional y/o HMA. Como se ha comentado en la Introducción, el uso de inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), como el sorafenib, ha surgido como una de estas estrategias terapéuticas alternativas para el tratamiento de la LMA.

Sorafenib es un inhibidor de FLT3 tipo 2 de 1ª generación (Tabla 5). Aunque su uso en el tratamiento de la LMA no ha sido aún aprobado, numerosos ensayos preclínicos y clínicos sugieren que podría ser efectivo, especialmente en los pacientes portadores de mutaciones “ITD” en el receptor FLT3 (Garciaz *et al.* 2023; Rollig *et al.* 2021), por lo que se ha incluido en la práctica asistencial en especial en el tratamiento de mantenimiento post-AloTPH (Burchert *et al.* 2020). A pesar de presentar resultados prometedores en algunos casos, se ha encontrado una importante variabilidad interindividual en la respuesta a este fármaco. La quimiorresistencia de las células de LMA es una de las posibles causas que justifican el fracaso en el tratamiento de estos pacientes con sorafenib.

Tabla 5. Principales inhibidores FLT3 con interés clínico.

<i>Clasificación</i>	Inhibidores FLT3 tipo 1	Inhibidores FLT3 tipo 2
<i>Mecanismo de acción</i>	Inhiben la conformación activa y la inactiva del receptor FLT3 Activos en mutaciones ITD y TKD	Inhiben sólo la conformación inactiva del receptor FLT3 Activos en mutaciones ITD
<i>Primera Generación</i>	Midostaurina	Sorafenib
<i>Segunda Generación</i>	Gilteritinib Crenolanib	Quizartinib

Los mecanismos responsables de la falta de respuesta a sorafenib en LMA no se conocen del todo. La identificación de los mecanismos de resistencia al sorafenib en otros tumores sugiere que los transportadores de membrana implicados en la captación y exportación de sorafenib, que determinan la cantidad de fármaco activo que alcanza las dianas intracelulares (Marin *et al.* 2016), son clave para la comprensión de la falta de efectividad del tratamiento. En tumores sólidos, se ha demostrado la importancia de los niveles de expresión del transportador OCT1 en la captación y el efecto antitumoral del sorafenib (Herraez *et al.* 2013). Además, se ha observado una relación directa entre la sobreexpresión de bombas exportadoras ABC y una

menor sensibilidad a este fármaco en distintos tipos de cáncer (Marin *et al.* 2012; Shibayama *et al.* 2011; Tandia *et al.* 2017; Tomonari *et al.* 2016).

Como **objetivo** de este segundo bloque del estudio, nos propusimos investigar la contribución de los transportadores de membrana responsables de la captación y la exportación del sorafenib, así como de sus principales dianas celulares, a la sensibilidad de líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana a este fármaco. Además, quisimos completar el estudio con la determinación del efecto del sorafenib sobre la expresión de transportadores en líneas celulares de LMA.

4.2.1. Efecto citostático del sorafenib en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana

Para evaluar el efecto del sorafenib sobre la viabilidad celular se utilizaron las mismas líneas celulares que en el Bloque 1 de esta tesis doctoral (MOLM-13, OCI-AML-2, HL-60, HEL y K-562) incluyendo la línea celular OCI-AML-2, la cual no presenta mutaciones en FLT3 (Tabla MM-1).

Para determinar el efecto citostático del sorafenib se determinó la viabilidad celular tras la exposición a diferentes concentraciones de sorafenib durante 72 h mediante el test de formazán. Como se observa en la Figura 11, en todas las líneas celulares investigadas se produjo un descenso dosis-dependiente de la viabilidad celular. Sin embargo, se observaron diferencias importantes entre ellas en la sensibilidad a este fármaco.

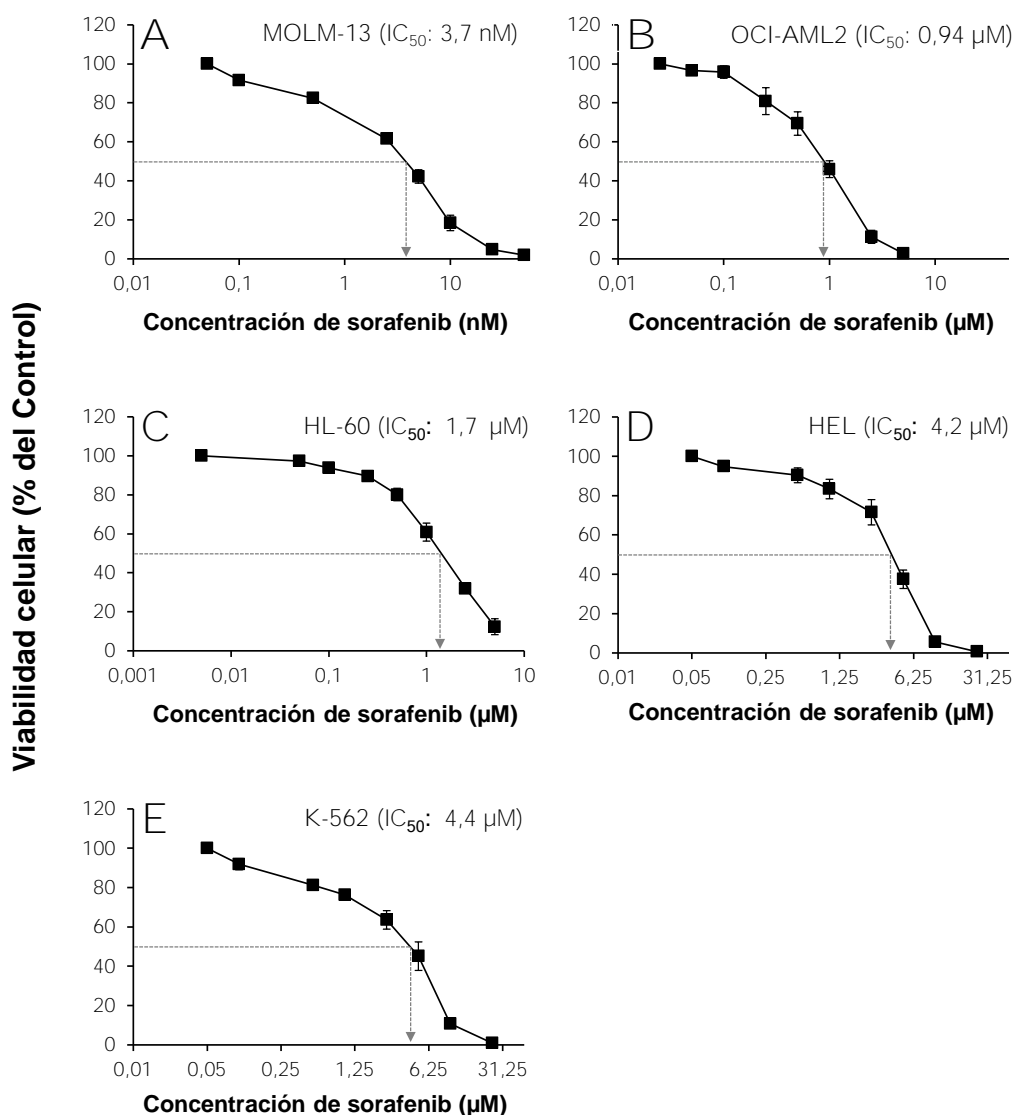


Figura 11. Efecto citostático del sorafenib sobre la viabilidad celular en las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 expuestas a concentraciones crecientes de fármaco durante 72 h. Los valores representan la media±EEM del porcentaje respecto al control (células no tratadas) de 3 experimentos realizados por triplicado IC₅₀: concentración de fármaco necesaria para reducir la viabilidad al 50%.

El orden de magnitud de la concentración necesaria para reducir el porcentaje de células vivas al 50% (IC₅₀) fue el siguiente: K-562 > HEL > HL-60 > OCI-AML2 >> MOLM-13. En las cuatro primeras líneas la concentración fue del orden de μM, mientras que la línea MOLM-13 fue la más sensible al sorafenib, siendo la IC₅₀ del orden de nM.

Hasta hace poco se aceptaba que las células de LMA con mutaciones en *FLT3-ITD* eran más sensibles al sorafenib, sin embargo, se ha descrito que las líneas con *FLT3* silvestres pueden presentar distintos grados de sensibilidad a este fármaco (Roelf *et al.* 2017) y, además, que algunas células *FLT3-ITD*⁺ presentaban una baja respuesta al sorafenib. En nuestro estudio, las células MOLM-13, portadoras de la mutación *FLT3-ITD*, fueron entre 250 y 1000 veces más sensibles al sorafenib que el resto de células analizadas. Sí se

encontraron diferencias en la sensibilidad entre las líneas celulares sin mutaciones en esta diana del fármaco. Esto sugiere que, además del estado mutacional del FLT3, existen otros factores que influyen en la respuesta al sorafenib. En nuestro estudio, en consonancia con otras investigaciones, las líneas celulares reflejan la marcada variabilidad en la respuesta a fármacos, que es similar a la que se observa en los resultados de supervivencia en los pacientes con LMA (Neubauer *et al.* 1987; Roelf *et al.* 2017).

Para completar el estudio de viabilidad celular, se evaluó el mecanismo de muerte celular en las líneas celulares determinando, mediante citometría de flujo, el porcentaje de apoptosis y necrosis tras la exposición a sorafenib durante 72 h utilizando Anexina V-PE y 7-AAD. Este método permite diferenciar varias poblaciones celulares en función de la fluorescencia detectada: células viables (Anexina V-PE negativo/7-AAD negativo), células en apoptosis temprana y tardía (Anexina V-PE positivo/7-AAD negativo y Anexina V-PE positivo/7-AAD positivo, respectivamente) y células necróticas (Anexina V-PE negativo/7-AAD positivo). La Figura 12 muestra imágenes representativas de resultados obtenidos con las células HEL sin tratamiento (Control) y expuestas a una concentración de 10 μ M de sorafenib.

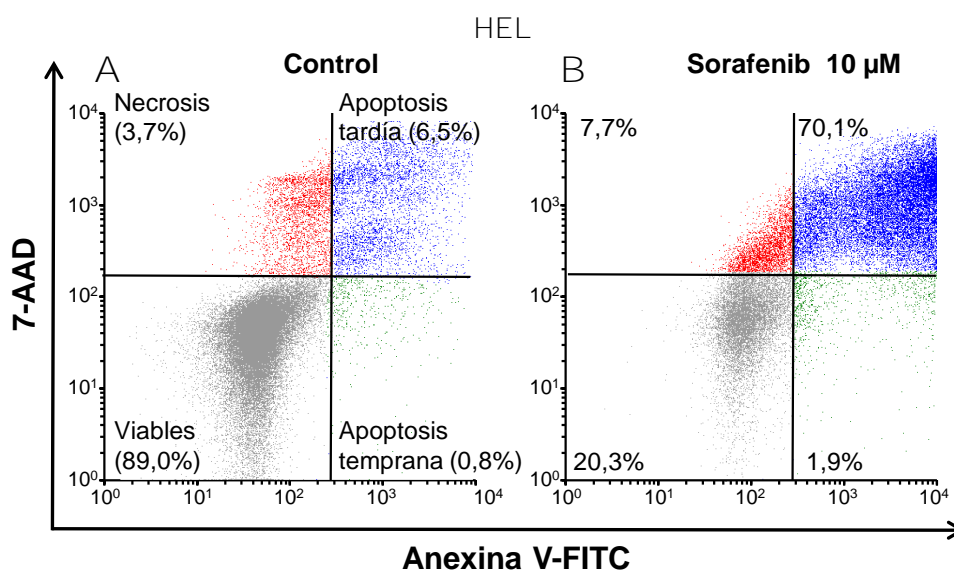


Figura 12. Imágenes representativas de células HEL control (A, no tratadas) e incubadas durante 72 h con una concentración 10 μ M de sorafenib (B) analizadas por citometría de flujo tras el marcaje con Anexina V-PE y 7-AAD. Siendo células viables, Anexina V-PE negativo/7-AAD negativo (gris); células en apoptosis, Anexina V-PE positivo (azul y verde); y células necróticas, Anexina V-PE negativo/7-AAD positivo (rojo).

Tras la adquisición y el análisis de los datos con el programa “Infinicyt”, se determinó el porcentaje de cada una de las poblaciones celulares sumando el porcentaje de células Anexina V-PE positivo/7-AAD negativo (apoptosis temprana) y de células Anexina V-PE positivo/7-AAD positivo (muerte celular por apoptosis o apoptosis tardía). La necrosis se corresponde con el porcentaje de células Anexina V-PE negativo/7-AAD positivo. En nuestro caso, fue un valor muy pequeño y, probablemente, se debió a un aumento de la fragilidad celular debido a la manipulación de las células durante el experimento.

En la Figura 13 se muestra el porcentaje de células muertas por apoptosis y por necrosis en las cinco líneas celulares en condiciones basales (sin sorafenib) y con la concentración indicada de sorafenib, que se eligió ligeramente superior a la IC_{50} para cada línea celular.

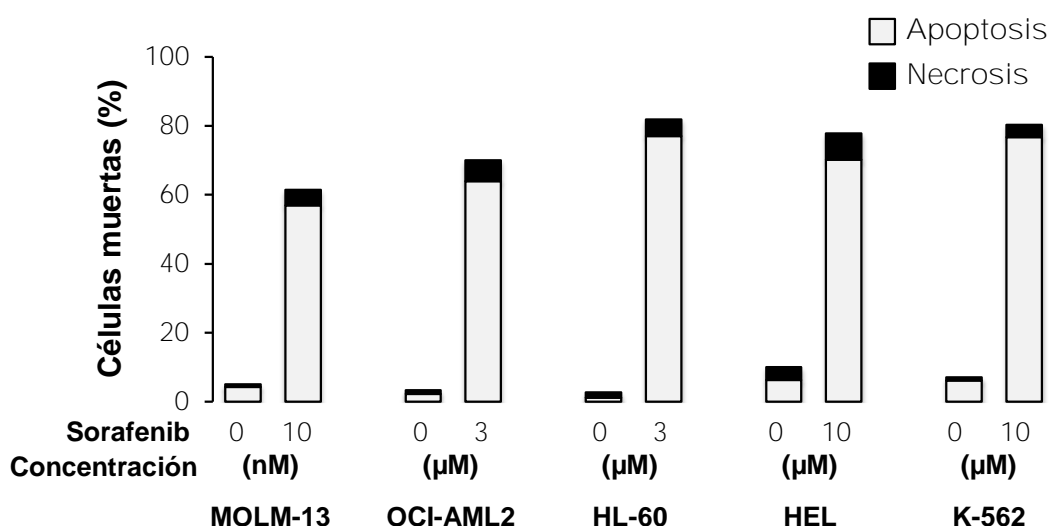


Figura 13. Porcentaje de muerte celular por apoptosis/necrosis en las líneas celulares de leucemia mieloide MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 incubadas durante 72 h con las concentraciones indicadas de sorafenib y analizadas por citometría de flujo tras incubación con anexina V-PE y 7-AAD. Los valores representan la media de 3 experimentos realizados por duplicado. En todos los casos el EEM fue <10% de la media.

Los resultados de viabilidad celular medidos mediante citometría de flujo fueron similares a los que se obtuvieron con el test de formazán en todas las líneas celulares (Figura 11). El sorafenib indujo muerte celular en el mismo rango de concentraciones determinado con ambos métodos. El hecho de que encontrásemos pequeñas variaciones se debe, probablemente, a que eran diferentes tipos de ensayos y, por tanto, las condiciones experimentales fueron distintas. La muerte celular se produjo principalmente por apoptosis, lo que concuerda con resultados previos que demuestran que el sorafenib inhibe la proliferación en células de LMA estimulando la vía intrínseca de apoptosis (Zhang *et al.* 2008).

4.2.2. Niveles basales de expresión de transportadores de membrana para el sorafenib en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana

Para que el sorafenib alcance sus dianas intracelulares es necesario que sea captado por las células cancerosas atravesando su membrana plasmática. Experimentos llevados a cabo con hepatocitos humanos en cultivo primario sugieren que la captación de sorafenib por estas células se lleva a cabo tanto por difusión simple como por transporte mediado por el OCT1 y por transportadores de aniones orgánicos (Swift *et al.* 2013).

En la Figura I-2 de la Introducción se representa de manera esquemática las familias de transportadores implicadas en el transporte de sorafenib. También se incluyen dos de los TKR sobre los que actúa este fármaco (FLT3 y KIT) y las vías de señalización que bloquea, dando como resultado la inhibición de la proliferación celular.

Para caracterizar el *transportoma* en condiciones basales en las células leucémicas se determinaron los niveles de expresión de los ARNm mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan respecto a los niveles de GAPDH para facilitar la comparación.

El transportador OCT1, que media el transporte facilitado de varios cationes orgánicos estructuralmente diferentes de origen endógeno y xenobióticos, se ha propuesto que podría jugar un papel importante en la captación de sorafenib (Herraez *et al.* 2013). También los transportadores de la misma familia OCT2 y OCT3, que son capaces de transportar diversos cationes orgánicos, podrían transportar sorafenib.

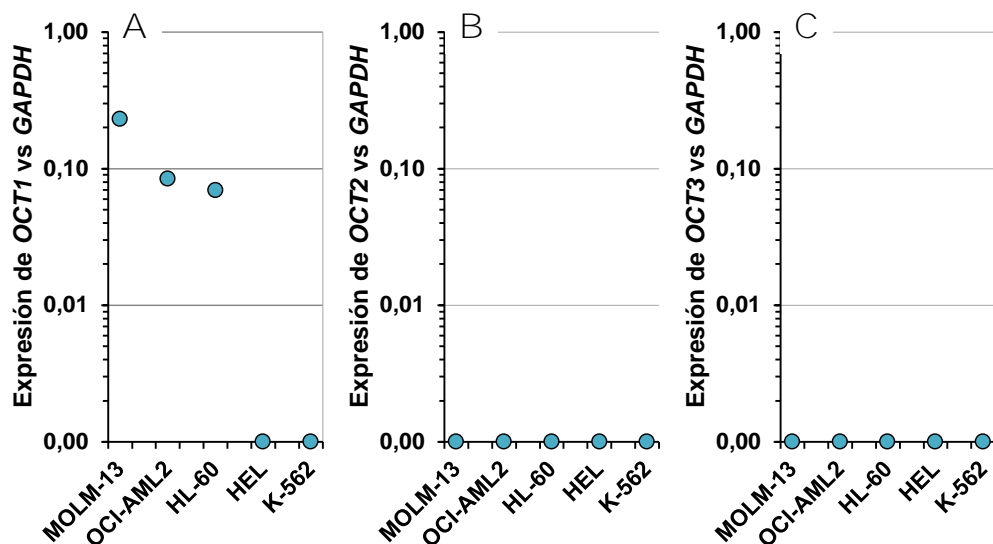


Figura 14. Niveles basales de expresión del ARNm de transportadores de cationes orgánicos OCT1 (A), OCT2 (B) y OCT3 (C) normalizados a la expresión de GAPDH en células MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 determinada por RT-qPCR. Los valores representan la media \pm EEM de 2 experimentos realizados por duplicado.

Los niveles de expresión de *SLC22A1*, gen que codifica OCT1, fueron muy bajos en las células HEL y K-562 y más elevados en las células MOLM-13 > OCI-AML2 \approx HL-60 (Figura 14A). Los niveles de *SLC22A2* y *SLC22A3*, que codifican OCT2 y OCT3, respectivamente, fueron indetectables en todas las líneas celulares (Figura 14B y 14C).

El tosilato de sorafenib es una molécula compleja y, a pesar de contener grupos protonables, que le darían carga neta positiva a pH fisiológico, se ha propuesto que podría ser sustrato de algunas OATPs (Swift *et al.* 2013). Algunos autores han sugerido que los verdaderos sustratos de estos transportadores son algunos metabolitos de sorafenib y no el propio fármaco sin

metabolizar (Zimmerman *et al.* 2013). Hay que señalar que los niveles de OATPs en estas líneas celulares fueron insignificantes (datos no mostrados).

Las tres líneas celulares que expresaban OCT1 fueron las más sensibles al sorafenib, pero no se puede descartar que otro/s transportador/es participen en la captación de sorafenib e incluso que, tras la larga exposición de 72 h en cultivo, el fármaco pueda acabar entrando en las células por difusión simple.

Por otra parte, la sobreexpresión de bombas ABC constituye uno de los principales mecanismos de quimiorresistencia en muchos tipos de cáncer, incluida la leucemia, debido a la capacidad de estas proteínas de expulsar los agentes quimioterápicos al exterior celular y reducir, por tanto, la cantidad de fármaco activo dentro de las células. Por esta razón decidimos analizar la expresión de las bombas de exportación que podrían conferir resistencia al sorafenib en estas líneas celulares (Marin *et al.* 2014; Shibayama *et al.* 2011; Tomonari *et al.* 2016).

La MDR1 (gen *ABCB1*) media la exportación de una gran cantidad de compuestos antitumorales y, entre ellos, se ha descrito el sorafenib (Lagas *et al.* 2010). Esta bomba no se detectó en las células OCI-AML2 y HL-60, mientras que estaba muy expresada en las células HEL >> K-562 > MOLM-13 (Figura 15A). La ausencia de esta bomba de exportación en las células OCI-AML2 y HL-60 puede favorecer que haya una mayor concentración intracelular de sorafenib, y podría contribuir a justificar la mayor sensibilidad de estas células en comparación con las HEL y K-562.

Se ha descrito que el sorafenib es sustrato de BCRP (gen *ABCG2*) (Lagas *et al.* 2010), por lo que también evaluamos la expresión de esta bomba. Aunque se encontraron diferencias en los niveles de expresión de BCRP en las cinco líneas celulares, los niveles fueron relativamente bajos (Figura 15B), lo que sugiere que, cuantitativamente, esta bomba de exportación puede tener un papel menos relevante en la expulsión del sorafenib en las líneas celulares estudiadas. No obstante, los mayores niveles del transportador se encontraron en las células HEL, una de las más resistentes al fármaco.

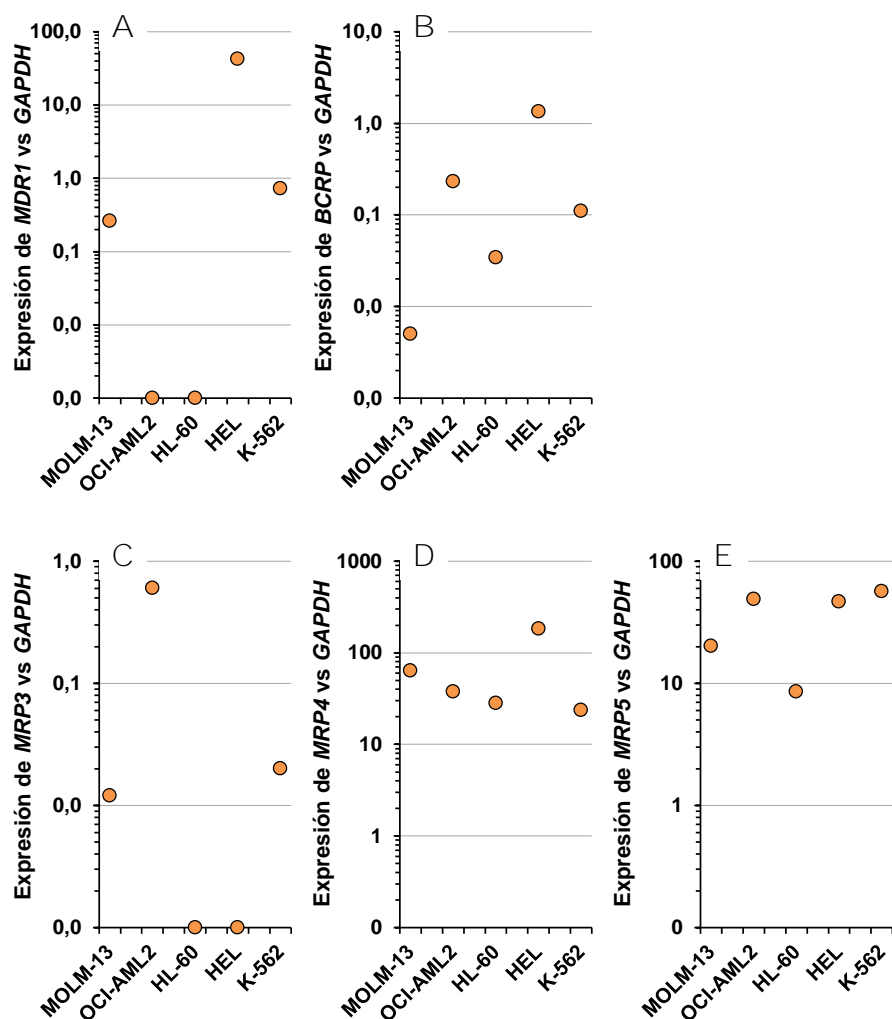


Figura 15. Niveles basales de expresión del ARNm de transportadores de exportación *MDR1* (A), *BCRP* (B), *MRP3* (C), *MRP4* (D) y *MRP5* (E) normalizados a la expresión de *GAPDH* en células MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 determinada por RT-qPCR. Los valores representan la media ± EEM de 2 experimentos realizados por duplicado.

Entre los miembros de la familia MRP, investigamos varios candidatos que se han relacionado con el transporte de sorafenib (Figura 15). Aunque el papel de cada uno de ellos no está claramente definido. La bomba MRP2 (gen *ABCC2*), que se ha descrito que es capaz de transportar sorafenib (Shibayama *et al.* 2011), no se detectó en ninguna línea celular (datos no mostrados). Se ha propuesto que la proteína MRP3 (gen *ABCC3*) puede conferir resistencia al sorafenib en el carcinoma hepatocelular (Tomonari *et al.* 2016). Esta bomba no se detectó en las células HL-60 ni HEL, y los niveles del ARNm de *ABCC3* fueron bajos en las líneas OCI-AML2, MOLM-13 y K-562 (Figura 15C). Se ha descrito que el sorafenib es un inhibidor de la proteína MRP4 (gen *ABCC4*) aunque no se ha demostrado que sea su sustrato (Drenberg *et al.* 2016). Se encontraron niveles elevados del ARNm de esta proteína en todas las líneas celulares, especialmente en las células HEL (Figura 15D). Por último, aunque no se conoce un posible papel de MRP5 (gen *ABCC5*) en el transporte de sorafenib, decidimos incluirlo, ya que esta bomba se ha encontrado elevada en células de leucemia (Guo *et al.* 2009). Coincidiendo con la información disponible en bibliografía, los niveles de

ARNm fueron elevados en todas las líneas celulares; K-562 \approx OCI-AML2 \approx HEL > MOLM-13 > HL-60 (Figura 15E).

Dada la importancia de las dianas moleculares del sorafenib, decidimos medir también los niveles de ARNm de los genes *FLT3* y *KIT*. Los dos TKRs están presentes en las células precursoras hematopoyéticas, desempeñando un papel importante en los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, y se encuentran muy expresados en los pacientes con LMA. La sobreexpresión o la presencia de mutaciones activadoras en *FLT3* conducen a la proliferación descontrolada de las células leucémicas (Zheng *et al.* 2004), con un impacto pronóstico aceptado en la práctica clínica, sin embargo, el valor de c-KIT actualmente no está claro (Schwartz *et al.* 1999).

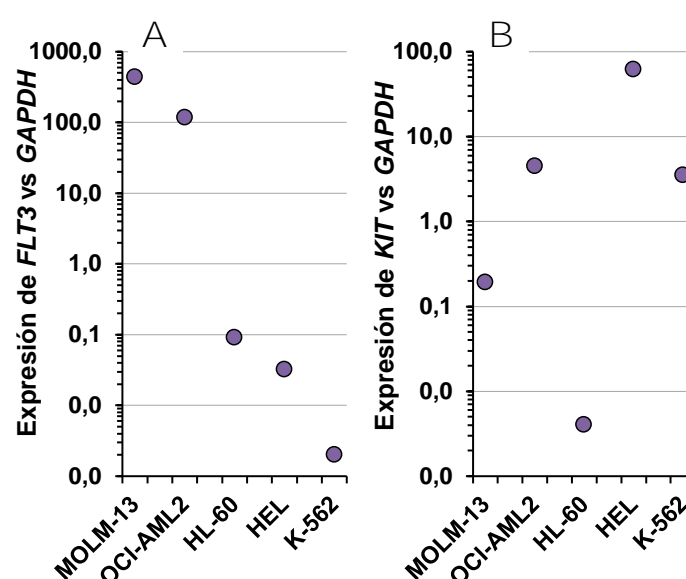


Figura 16. Niveles basales de expresión del ARNm de las dianas de sorafenib *FLT3* (A) y *KIT* (B) normalizados a la expresión de *GAPDH* en células MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 determinada por RT-qPCR. Los valores representan la media \pm EEM de 2 experimentos realizados por duplicado.

De las cinco líneas celulares estudiadas, MOLM-13 es la única que presenta una mutación en *FLT3* (*FLT3-ITD*), y en ninguna de ellas se encuentra mutado el receptor c-KIT. La expresión de ambos se evaluó en este estudio, encontrando que para *FLT3* los valores en las células MOLM-13 fueron 4 veces mayores que en OCI-AML2 y 4.000 veces mayores que en el resto de células en las que la expresión fue muy baja (Figura 16A), es decir, que en las células MOLM-13, el receptor *FLT3* además de estar mutado, se encuentra muy expresado, lo cual también puede influir en la sensibilidad al sorafenib. Entre las células sin mutaciones en *FLT3*, los niveles de *FLT3* son mucho mayores en las células OCI-AML2 que en el resto de células, lo cual podría justificar que sea la línea más sensible de las que carecen de mutaciones.

En cuanto a c-KIT, los valores de ARNm fueron variables (Figura 16B), siendo mayores en HEL, aunque esto no parece conferir sensibilidad al sorafenib, puesto que esta línea celular fue una de las menos sensibles al fármaco (Figura 11).

4.2.3. Efecto del sorafenib sobre la expresión de transportadores de membrana en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana

Uno de los principales problemas de la terapia con sorafenib en pacientes con LMA, al igual que ocurre con otros fármacos antitumorales, es la pérdida de respuesta durante el tratamiento debido a la aparición de quimiorresistencia. Por ello, a continuación, nos planteamos investigar el efecto del sorafenib sobre la expresión de los genes implicados en su transporte en las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana. Para este estudio *in vitro* de la resistencia adquirida al sorafenib expusimos las células durante 72 h a una concentración de fármaco próxima a la IC₅₀ de cada línea celular, obtenida previamente mediante el test de formazán (Figura 11). Transcurrido ese tiempo analizamos, mediante RT-qPCR, la expresión a nivel de ARNm de los transportadores y comparamos los valores obtenidos con los niveles basales que se han descrito anteriormente.

Puesto que OCT1 está implicado en la captación del sorafenib, una reducción en la expresión de este transportador podría suponer una disminución del efecto terapéutico como consecuencia de una menor concentración intracelular del fármaco. La Figura 14 muestra los niveles de OCT1 normalizados frente a la expresión de GAPDH en las cinco líneas celulares antes y después del tratamiento con sorafenib. No se detectaron cambios significativos en la expresión de OCT1 tras la exposición al fármaco en las células HL-60 y OCI-AML2 y sólo una tendencia a disminuir en las MOLM-13. En las células HEL y K-562 los niveles de ARNm continuaron siendo insignificantes (Figura 17).

La exposición de las células al sorafenib indujo un aumento en la expresión de MRP3 en las células HL-60, MOLM-13 y K-562, siendo mayor el incremento en las MOLM-13, y no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de este transportador en las células HEL y OCI-AML2 (Figura 17).

	OCT1		OCT2		OCT3		FLT3		KIT		
	Control	+Soraf	Control	+Soraf	Control	+Soraf	Control	+Soraf	Control	+Soraf	
MOLM-13	0,23	0,15	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	435	891	0,19	1,10	
OCI-AML2	0,084	0,084	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	117	113	4,44	1,30	
HL-60	0,069	0,078	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,090	0,64	0,004	0,04	
HEL	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,032	0,027	61,8	66,9	<0,001
K-562	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,002	3,49	4,14	<0,05

	MDR1		BCRP		MRP3		MRP4		MRP5		
	Control	+Soraf	Control	+Soraf	Control	+Soraf	Control	+Soraf	Control	+Soraf	
MOLM-13	0,26	<0,001	0,005	0,004	0,012	0,088	63,5	105	20,2	56,5	<0,1
OCI-AML2	<0,001	<0,001	0,23	0,20	0,060	0,08	37,4	46,5	48,6	54,5	<5
HL-60	<0,001	<0,001	0,034	0,054	<0,001	0,005	28,1	24,1	8,5	9,1	<100
HEL	42,2	30,1	1,34	0,87	<0,001	0,001	183	198	46,7	46,3	<500
K-562	0,72	1,42	0,11	0,048	0,020	0,076	23,5	23,9	56,4	82	<1000

Expresión de ARNm normalizada a GAPDH

Figura 17. Expresión de ARNm inducida por exposición durante 72 h a una concentración de sorafenib próxima a la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) normalizada a la expresión de GAPDH de transportadores y dianas moleculares del sorafenib en células MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 (B) determinada por RT-qPCR. Los valores representan la media±EEM de 2 experimentos realizados por duplicado.

Es interesante destacar el aumento de la expresión de MRP3 en las células HL-60, puesto que en esta línea celular no tratada los niveles de ARNm eran indetectables. El incremento observado de los niveles de MRP3 en respuesta al sorafenib concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Tomonari *et al.* 2016), siendo un mecanismo de defensa de las células tumorales frente al fármaco, ya que reducen su concentración intracelular. Las otras bombas de exportación estudiadas, MRP4 y BCRP, no sufrieron cambios significativos en sus niveles de expresión en ninguna de las líneas celulares. Tampoco encontramos cambios relevantes en los niveles de ARNm correspondiente a MDR1, excepto en las células MOLM-13, en las que sorprendentemente se observó una caída en la expresión de este transportador tras el tratamiento con sorafenib, alcanzando niveles indetectables (Figura 17).

Al igual que en condiciones basales, también se determinó la expresión del ARNm de FLT3 y c-KIT tras la exposición al sorafenib y apenas se observaron cambios en los niveles de ambas dianas excepto un aumento en la expresión de FLT3 en las células HL-60 y de c-KIT en las MOLM-13 (Figura 17).

4.2.4. Estudios funcionales de transporte en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide humana

Además de analizar la expresión a nivel de ARNm de los transportadores implicados en la captación y exportación del sorafenib, decidimos evaluar su actividad en las mismas líneas celulares mediante estudios de citometría de flujo. Como se describió en el apartado 3.5 de Material y Métodos, se utilizaron sustratos fluorescentes para los distintos transportadores a estudiar, así como inhibidores de su actividad.

Para determinar la actividad de MDR1 utilizamos como sustrato la rodamina 123. Para ello, se incubaron las células con rodamina 123 durante 30 min de modo que se consiguió una carga celular de sustrato adecuada. A continuación, se diluía el medio 1:10 con una solución que no contenía el sustrato fluorescente y tras una incubación también de 30 min se determinó de nuevo el contenido en rodamina 123. La Figura 18A muestra la carga y la exportación de rodamina 123 expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Como podemos observar, la carga en las células HEL fue la menor de todas las líneas celulares, y la exportación mediada por MDR1 fue mucho mayor en estas células que en las otras tres líneas celulares.

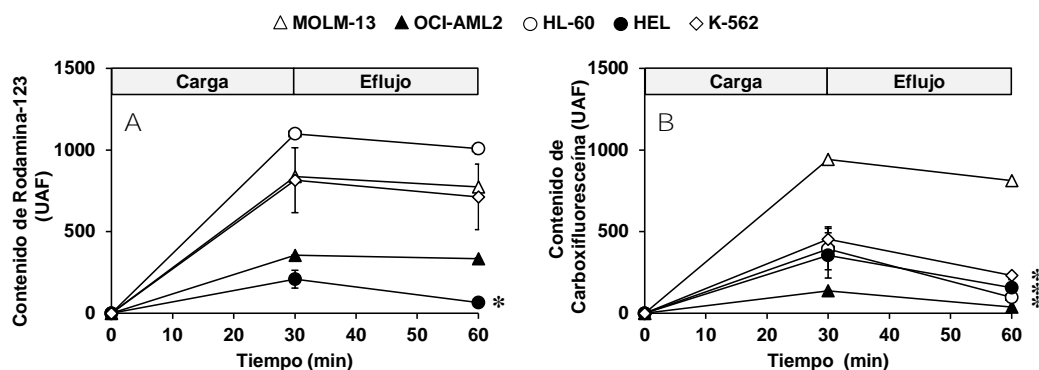


Figura 18. Evolución temporal de la acumulación intracelular de sustratos fluorescentes en las células de leucemia mieloide MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 en los periodos de carga y exportación. Tras cargar las células con 1 μ M rodamina-123 (A) o 1 μ M carboxifluoresceína diacetato (B), a 37°C durante 30 min (periodo de carga) se diluyeron 1:10 con medio sin sustrato y se incubaron a 37°C durante 30 min. Los valores representan la media \pm EEM de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado determinados por citometría de flujo. *, $p < 0,05$, comparado con el contenido de sustrato tras el periodo de carga.

Además, la exportación de rodamina 123 se redujo significativamente en las células HEL en presencia de verapamilo, un inhibidor típico de MDR1, mientras que la exportación en las K-562, HL-60 y MOLM-13 prácticamente no varió (Figura 19A). Estos resultados sugieren que la alta actividad de MDR1 detectada en las células HEL podría jugar un papel importante en la expulsión del sorafenib en estas células.

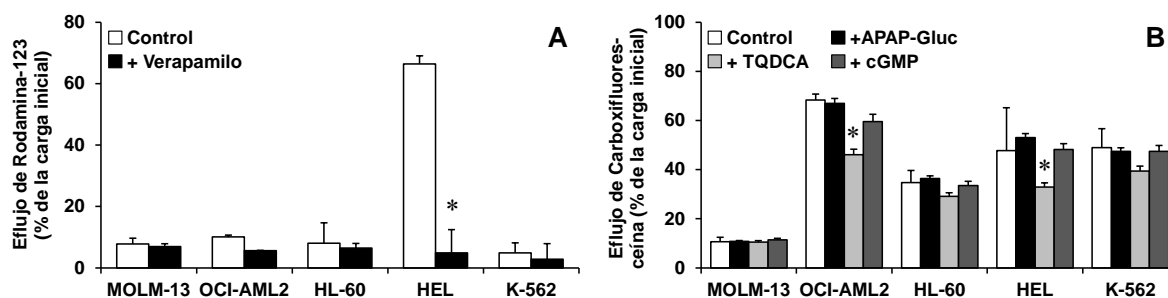


Figura 19. Exportación de los sustratos fluorescentes de bombas ABC en las células de leucemia mieloide MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 precargadas. Tras cargar las células con 1 μM rodamina-123 (A) o 1 μM carboxifluoresceína diacetato (B), a 37°C durante 30 min (periodo de carga) se diluyeron 1:10 con medio que contenía o no los inhibidores específicos de bombas ABC –10 μM verapamilo (MDR1), 100 μM APAP glucurónido (MRP3), 100 μM ácido tauroquenodesoxicólico (TQDCA) (MRP3 y MRP4), 500 μM cGMP (MRP4 y MRP5)– y se incubaron a 37°C durante 30 min. Los valores representan la media \pm EEM de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado determinados por citometría de flujo. *, $p < 0,05$, comparado con el contenido de sustrato en ausencia de inhibidor (Control) por el test de t de Student (A) o por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni (B).

Por otra parte, también evaluamos el papel exportador de fármacos de las proteínas MRP3-5 en las cinco líneas celulares mediante experimentos de citometría de flujo en los que utilizamos como sustrato de estas MRPs la carboxifluoresceína. Este compuesto se capta en forma de carboxifluoresceína diacetato no fluorescente mediante un proceso de difusión simple. Posteriormente es convertido a carboxifluoresceína por las esterasas celulares generando así un compuesto fluorescente que es transportado por las bombas MRPs. Como se observa en la Figura 18B la carga de carboxifluoresceína fue mayor en las células MOLM-13 y la exportación se redujo significativamente en las células HL-60, HEL y K-562. Cuando se analizó la exportación de carboxifluoresceína en presencia del ácido biliar tauroquenodesoxicólico (TQDCA) se observó una reducción significativa en las células HEL, OCI-AML2 y K-562 (Figura 19B), y en ninguna de las células se afectó la exportación en presencia de APAP glucurónido o de cGMP lo que sugiere que MRP4 era funcional en estas líneas celulares.

A pesar de que el análisis de expresión a nivel de ARNm por RT-qPCR mostró niveles muy altos de MRP4 y MRP5 en las cinco líneas celulares estudiadas, la actividad de estas MRPs en las MOLM-13 fue baja, lo que sugiere que estas proteínas probablemente no juegan un papel relevante en la quimiorresistencia de esta línea celular. Si el sorafenib fuera sustrato de MRP4, la menor actividad de esta proteína en las células MOLM-13, en comparación con las otras líneas celulares, puede ser uno de los factores que explique la mayor sensibilidad de las MOLM-13 al sorafenib.

Como se observa en la Figura 20, comprobamos que la actividad de BCRP fue baja en todas las líneas celulares utilizando dos sustratos diferentes de esta bomba; BODIPY-prazosina (Figura 20A) y mitoxantrona (Figura 20B).

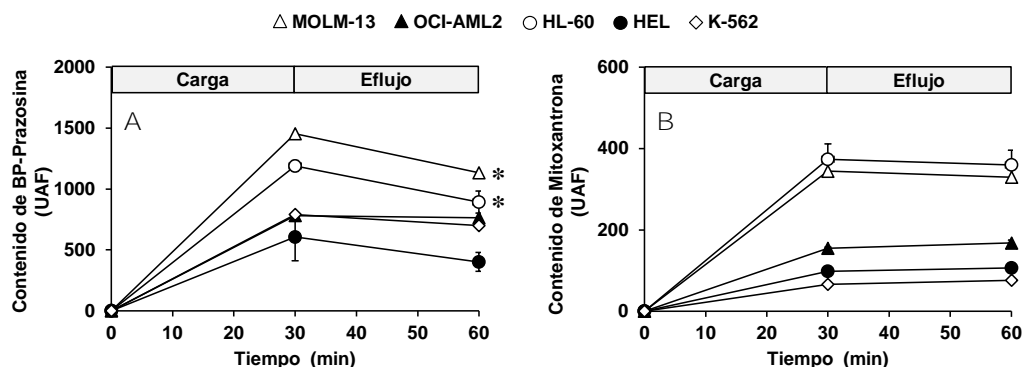


Figura 20. Evolución temporal de la acumulación intracelular de sustratos fluorescentes de BCRP en las células de leucemia mieloide MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 en los periodos de carga y exportación. Tras cargar las células con 1 μM BODIPY-prazosina (A) o 25 μM mitoxantrona (B), a 37°C durante 30 min (periodo de carga) se diluyeron 1:10 con medio sin sustrato y se incubaron a 37°C durante 30 min. Los valores representan la media \pm EEM de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado determinados por citometría de flujo. *, $p < 0,05$, comparado con el contenido de sustrato tras el periodo de carga.

En concordancia con estos resultados, no se encontró un efecto detectable del inhibidor específico de BCRP, la fumitremorgina C, ni sobre la exportación de BODIPY-prazosina (Figura 21A) ni sobre el de mitoxantrona (Figura 21B), lo que concuerda con la baja expresión de esta bomba exportadora.

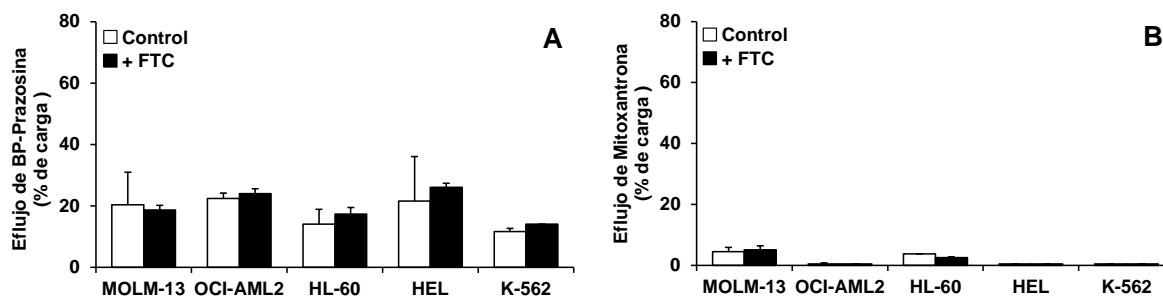


Figura 21. Exportación de los sustratos fluorescentes de BCRP en las células de leucemia mieloide MOLM-13, OCI-AML2, HL-60, HEL y K-562 precargadas. Tras cargar las células con 1 μM BODIPY-prazosina (A) o 25 μM mitoxantrona (B), a 37°C durante 30 min (periodo de carga) se diluyeron 1:10 con medio que contenía o el inhibidor específico de BCRP fumitremorgina C (FTC) 5 μM y se incubaron a 37°C durante 30 min. Los valores representan la media \pm EEM de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado determinados por citometría de flujo. *, $p > 0,05$, comparado con el contenido de sustrato en ausencia de inhibidor (Control) por el test de *t* de Student.

La funcionalidad de OCT1 en las líneas celulares estudiadas se determinó mediante experimentos de captación, en ausencia o presencia de distintos inhibidores, en los que se incubaron las células en presencia de dihidroetidio (DHE), un compuesto catiónico a pH fisiológico que es sustrato de transportadores de cationes orgánicos. Como se muestra en la figura 22, el 2-cloro-metilpiridinio (cloro-MP) resultó ser el más potente como inhibidor y, además, no presentaba toxicidad en las líneas celulares estudiadas en las condiciones experimentales utilizadas (datos no mostrados), por lo que se seleccionó para los siguientes experimentos.

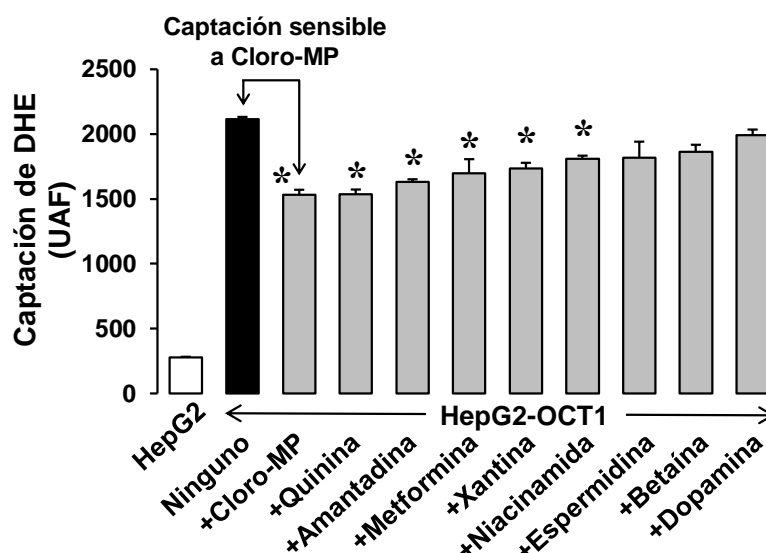


Figura 22. Captación de dihidroetidio (DHE) en células HepG2 transducidas o no con lentivirus OCT1 *wild-type* en ausencia de inhibidores o en presencia de uno de los siguientes compuestos: cloro-MP, quinina, amantadina, metformina, xantina, niacinamida, espermidina, betaína, o dopamina. Los valores representan la media \pm EEM de 2 experimentos llevados a cabo por triplicado determinados por citometría de flujo. *, $p < 0,05$, comparado con las células incubadas en ausencia de inhibidores de OCT1 por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En la figura 23 se muestra la captación de DHE sensible a la inhibición por cloro-MP. Comparando las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide, las células MOLM-13 presentaron una captación de este compuesto significativamente superior al resto, aunque los valores fueron menores que los encontrados en el modelo celular que se utilizó como control positivo, que fueron células HepG2, derivadas de hepatoblastoma humano, establemente transducidas con lentivirus que portaban la ORF de OCT1.

El nivel de actividad de este transportador se relacionó con los niveles de expresión de OCT1 determinados por RT-qPCR, puesto que la expresión de este transportador fue mayor en MOLM-13 que en OCI-AML2 y HL-60 y no detectable en las otras dos líneas celulares (Figura 14).

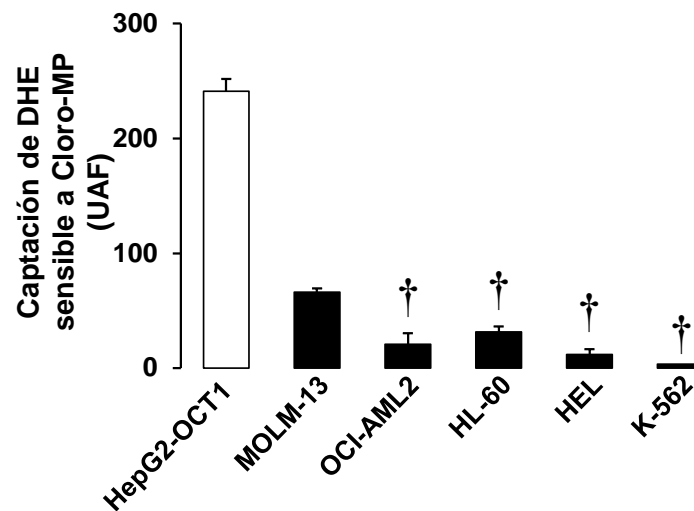


Figura 23. Captación de dihidroetidio (DHE) en células de leucemia mieloide humanas incubadas con medio de captación conteniendo $5 \mu\text{M}$ DHE en presencia o ausencia de $100 \mu\text{M}$ cloro-MP durante 30 min a 37°C antes de medir la fluorescencia de las células por citometría de flujo y se determinó la diferencia. Las células HepG2 establemente transducidas con lentivirus con OCT1 se incluyeron como control positivo. Los valores representan la media \pm EEM de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado determinados por citometría de flujo. †, $p < 0,05$, comparado con las células MOLM-13 por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para analizar la contribución de OCT1 a la sensibilidad de las células leucémicas al sorafenib, seleccionamos las células HEL, debido a que tenían unos niveles basales de este transportador casi indetectables y la menor sensibilidad al sorafenib de todas las líneas estudiadas. Estas células fueron transfectadas con un plásmido que contenía la ORF de OCT1 o con una variante mutada inactiva del transportador. Como se muestra en la Figura 24A, la expresión del OCT1 silvestre, pero no de la forma mutada, confería a las células la capacidad de captar DHE. En el ensayo, también se incluyeron células no transfectadas (Mock), como comparación.

Observamos que la expresión de OCT1 en las células HEL las hacía más sensibles al sorafenib (Figura 24). Así, cuando las células HEL no transfectadas o transfectadas con OCT1 silvestre o con la forma mutada se expusieron durante un periodo de tiempo corto (4 h) a sorafenib ($10 \mu\text{M}$), y posteriormente, el medio se sustituía por otro medio nuevo sin sorafenib y se determinaba la viabilidad celular 68 h más tarde, se podía comprobar que sólo en las células que expresaban el OCT1 funcional se confería mayor capacidad para que entrara más fármaco y se reducía la viabilidad celular significativamente.

Estos experimentos permiten concluir que la expresión de OCT1 funcional en las células de LMA es importante para la respuesta al sorafenib.

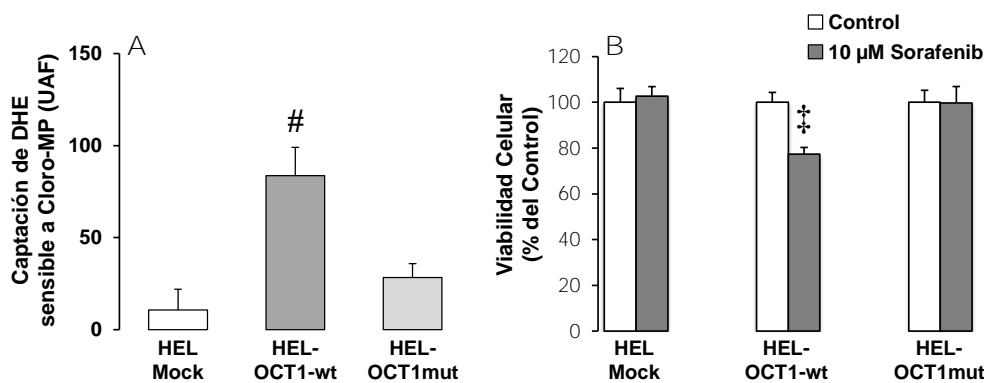


Figura 24. Efecto de la expresión de OCT1 silvestre (wt) o de una variante inactiva en la captación de DHE sensible a cloro-MP en células HEL (A) y en la viabilidad celular determinada a las 72 h después de ser incubadas con 10 μ M sorafenib durante sólo 4 h. Los experimentos también se realizaron en células no transfectadas (Mock). Los valores representan la media \pm EEM de 2 experimentos llevados a cabo por triplicado. #, $p < 0,05$, comparado con células no transfectadas (Mock) por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni; ‡, $p < 0,05$, comparado con las células no tratadas con sorafenib (Control) por el test de t de Student.

Se ha observado que una pérdida de expresión de OCT1 es frecuente en tumores sólidos (Herraez *et al.* 2013) y también en blastos de pacientes con LMA en comparación con los blastos de individuos sanos (Stefanko *et al.* 2017). Además, hay que mencionar que, recientemente se ha asociado la presencia de OCT1 en la membrana plasmática de las células tumorales con una mejor respuesta en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado tratados con sorafenib (Geier *et al.* 2017). Los resultados obtenidos en este estudio podrían tener implicaciones clínicas, ya que la identificación de los mecanismos implicados en la quimiorresistencia al sorafenib puede ser útil para identificar a aquellos pacientes con pocas probabilidades de responder a este tratamiento, y también para buscar estrategias terapéuticas que aumenten su eficacia.

En conjunto, los resultados de este estudio *in vitro* apoyan la necesidad de llevar a cabo investigaciones clínicas que permitan esclarecer una posible asociación entre la respuesta clínica al sorafenib y la expresión funcional de proteínas implicadas en la captación y la exportación de sorafenib en blastos de pacientes con LMA.

Conclusiones

Conclusión primera

El estudio del papel de los transportadores implicados en la captación y la exportación de citarabina e idarrubicina y de las enzimas metabolizadoras de nucleósidos en blastos de pacientes con LMA reveló la existencia de una elevada expresión de la proteína ABC, implicada en la resistencia a múltiples fármacos MDR1 y de las enzimas inactivadoras 5-NT y CDA. Los niveles de ARNm de los genes codificantes se asociaron a la aparición de peor respuesta al tratamiento QT, probablemente debido a una disminución de la concentración del fármaco activo en el interior de las células leucémicas.

Conclusión Segunda

Los resultados del análisis de colinearidad de expresión génica sugieren que la determinación de los niveles de ARNm del par de genes DCK y 5-NT en los blastos de pacientes con LMA puede tener interés predictivo de mal pronóstico en relación a la respuesta a la quimioterapia de inducción. De acuerdo con los resultados de nuestro estudio el análisis conjunto de los niveles de expresión de estos dos genes podría identificar a priori un 75% de los pacientes que responderán satisfactoriamente a la QT de inducción.

Conclusión tercera

En modelos celulares de LMA, la exposición a citarabina e idarrubicina en células leucémicas induce cambios de expresión de los transportadores de estos fármacos. Sin embargo, los estudios funcionales sugieren que estos cambios no tienen un impacto relevante en su respuesta a estos fármacos.

Conclusión cuarta

El sorafenib es un inhibidor multikinasa que induce muerte celular por apoptosis en líneas celulares de LMA y cuya eficacia farmacológica puede relacionarse con la expresión de TKR, principalmente del receptor FLT3, así como con la actividad y expresión de bombas exportadoras de fármacos como MDR1, MRP4 y MRP5.

Conclusión quinta

La expresión y actividad del transportador de captación OCT1 se relacionan con la respuesta al sorafenib en varios tipos de cáncer, al condicionar su capacidad de alcanzar sus dianas intracelulares. La expresión forzada de OCT1 en células de LMA consigue reducir la quimiorresistencia al sorafenib.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A., S. Varatharajan, S. Abbas, W. Zhang, R. V. Shaji, R. Ahmed, A. Abraham, B. George, A. Srivastava, M. Chandy, V. Mathews and P. Balasubramanian (2012). "Cytidine deaminase genetic variants influence RNA expression and cytarabine cytotoxicity in acute myeloid leukemia." *Pharmacogenomics* **13**(3): 269-282.
- Abraham, A., S. Varatharajan, S. Karathedath, C. Philip, K. M. Lakshmi, A. K. Jayavelu, E. Mohanan, N. B. Janet, V. M. Srivastava, R. V. Shaji, W. Zhang, A. Abraham, A. Viswabandya, B. George, M. Chandy, A. Srivastava, V. Mathews and P. Balasubramanian (2015). "RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia." *Pharmacogenomics* **16**(8): 877-890.
- Adema, A. D., K. Floor, K. Smid, R. J. Honeywell, G. L. Scheffer, G. Jansen and G. J. Peters (2014). "Overexpression of MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) confer resistance to the nucleoside analogs cytarabine and troxacitabine, but not gemcitabine." *Springerplus* **3**: 732.
- Ades, L., R. Itzykson and P. Fenaux (2014). "Myelodysplastic syndromes." *Lancet* **383**(9936): 2239-2252.
- Al-Abdulla, R., E. Lozano, R. I. R. Macias, M. J. Monte, O. Briz, C. J. O'Rourke, M. A. Serrano, J. M. Banales, M. A. Avila, M. L. Martinez-Chantar, A. Geier, J. B. Andersen and J. J. G. Marin (2019). "Epigenetic events involved in organic cation transporter 1-dependent impaired response of hepatocellular carcinoma to sorafenib." *Br J Pharmacol* **176**(6): 787-800.
- Appelbaum, F. R., H. Gundacker, D. R. Head, M. L. Slovak, C. L. Willman, J. E. Godwin, J. E. Anderson and S. H. Petersdorf (2006). "Age and acute myeloid leukemia." *Blood* **107**(9): 3481-3485.
- Arber, D. A. (2001). "Realistic pathologic classification of acute myeloid leukemias." *Am J Clin Pathol* **115**(4): 552-560.
- Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola and J. W. Vardiman (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." *Blood* **127**(20): 2391-2405.
- Baran, Y., B. Gur, P. Kaya, A. U. Ural, F. Avcu and U. Gunduz (2007). "Upregulation of multi drug resistance genes in doxorubicin resistant human acute myelogenous leukemia cells and reversal of the resistance." *Hematology* **12**(6): 511-517.
- Barragan, E., M. Collado, J. Cervera, G. Martin, P. Bolufer, J. Roman and M. A. Sanz (2007). "The GST deletions and NQO1*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia." *Leuk Res* **31**(7): 947-953.
- Bauer, T. R., B. R. Schwartz, W. C. Liles, H. D. Ochs and D. D. Hickstein (1998). "Retroviral-mediated gene transfer of the leukocyte integrin CD18 into peripheral blood CD34+ cells derived from a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1." *Blood* **91**(5): 1520-1526.
- Benderra, Z., A. M. Faussat, L. Sayada, J. Y. Perrot, D. Chaoui, J. P. Marie and O. Legrand (2004). "Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias." *Clin Cancer Res* **10**(23): 7896-7902.
- Benderra, Z., A. M. Faussat, L. Sayada, J. Y. Perrot, R. Tang, D. Chaoui, H. Morjani, C. Marzac, J. P. Marie and O. Legrand (2005). "MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia." *Clin Cancer Res* **11**(21): 7764-7772.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." *Br J Haematol* **33**(4): 451-458.

Bhatla, D., R. B. Gerbing, T. A. Alonzo, H. Conner, J. A. Ross, S. Meshinchi, X. Zhai, T. Zamzow, P. A. Mehta, H. Geiger, J. Perentesis and S. M. Davies (2009). "Cytidine deaminase genotype and toxicity of cytosine arabinoside therapy in children with acute myeloid leukemia." *Br J Haematol* **144**(3): 388-394.

Birtwistle, J., R. E. Hayden, F. L. Khanim, R. M. Green, C. Pearce, N. J. Davies, N. Wake, H. Schrewe, J. P. Ride, J. K. Chipman and C. M. Bunce (2009). "The Aldo-Keto Reductase AKR1C3 contributes to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-3,4-dihydrodiol mediated oxidative DNA damage in myeloid cells: implications for leukemogenesis." *Mutat Res* **662**(1-2): 67-74.

Briz, O., M. J. Perez and J. J. G. Marin (2017). "Further understanding of mechanisms involved in liver cancer chemoresistance." *Hepatoma Research* **3**(22-6).

Broxterman, H. J., P. Sonneveld, W. J. van Putten, J. Lankelma, C. A. Eekman, G. J. Ossenkoppele, H. M. Pinedo, B. Lowenberg and G. J. Schuurhuis (2000). "P-glycoprotein in primary acute myeloid leukemia and treatment outcome of idarubicin/cytosine arabinoside-based induction therapy." *Leukemia* **14**(6): 1018-1024.

Bullinger, L., K. Dohner and H. Dohner (2017). "Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways." *J Clin Oncol* **35**(9): 934-946.

Burchert, A., G. Bug, L. V. Fritz, J. Finke, M. Stelljes, C. Rollig, E. Wollmer, R. Wasch, M. Bornhauser, T. Berg, F. Lang, G. Ehninger, H. Serve, R. Zeiser, E. M. Wagner, N. Kroger, C. Wolschke, M. Schleuning, K. S. Gotze, C. Schmid, M. Crysandt, E. Esseling, D. Wolf, Y. Wang, A. Bohm, C. Thiede, T. Haferlach, C. Michel, W. Bethge, T. Wundisch, C. Brandts, S. Harnisch, M. Wittenberg, H. G. Hoeffkes, S. Rospleszcz, A. Burchardt, A. Neubauer, M. Brugger, K. Strauch, C. Schade-Brittinger and S. K. Metzelder (2020). "Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With FLT3-Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN)." *J Clin Oncol* **38**(26): 2993-3002.

Burnett, A. K., N. H. Russell, R. K. Hills, A. E. Hunter, L. Kjeldsen, J. Yin, B. E. Gibson, K. Wheatley and D. Milligan (2013). "Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial." *J Clin Oncol* **31**(27): 3360-3368.

Campo, E., S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein and E. S. Jaffe (2011). "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications." *Blood* **117**(19): 5019-5032.

Cancer Genome Atlas Research, N., T. J. Ley, C. Miller, L. Ding, B. J. Raphael, A. J. Mungall, A. Robertson, K. Hoadley, T. J. Triche, Jr., P. W. Laird, J. D. Baty, L. L. Fulton, R. Fulton, S. E. Heath, J. Kalicki-Veizer, C. Kandoth, J. M. Klco, D. C. Koboldt, K. L. Kanchi, S. Kulkarni, T. L. Lamprecht, D. E. Larson, L. Lin, C. Lu, M. D. McLellan, J. F. McMichael, J. Payton, H. Schmidt, D. H. Spencer, M. H. Tomasson, J. W. Wallis, L. D. Wartman, M. A. Watson, J. Welch, M. C. Wendl, A. Ally, M. Balasundaram, I. Birol, Y. Butterfield, R. Chiu, A. Chu, E. Chuah, H. J. Chun, R. Corbett, N. Dhalla, R. Guin, A. He, C. Hirst, M. Hirst, R. A. Holt, S. Jones, A. Karsan, D. Lee, H. I. Li, M. A. Marra, M. Mayo, R. A. Moore, K. Mungall, J. Parker, E. Pleasance, P. Plettner, J. Schein, D. Stoll, L. Swanson, A. Tam, N. Thiessen, R. Varhol, N. Wye, Y. Zhao, S. Gabriel, G. Getz, C. Sougnez, L. Zou, M. D. Leiserson, F. Vandin, H. T. Wu, F. Applebaum, S. B. Baylin, R. Akbani, B. M. Broom, K. Chen, T. C. Motter, K. Nguyen, J. N. Weinstein, N. Zhang, M. L. Ferguson, C. Adams, A. Black, J. Bowen, J. Gastier-Foster, T. Grossman, T. Lichtenberg, L. Wise, T. Davidsen, J. A. Demchok, K. R. Shaw, M. Sheth, H. J. Sofia, L. Yang, J. R. Downing and G. Eley (2013). "Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia." *N Engl J Med* **368**(22): 2059-2074.

Cicconi, L. and F. Lo-Coco (2016). "Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia." *Ann Oncol* **27**(8): 1474-1481.

Cornelissen, J. J. and B. Lowenberg (2005). "Role of allogeneic stem cell transplantation in current treatment of acute myeloid leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 151-155.

Cristobal, I., L. Garcia-Orti, C. Cirauqui, M. M. Alonso, M. J. Calasanz and M. D. Otero (2011). "PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect." *Leukemia* **25**(4): 606-614.

Chapuy, B., R. Koch, U. Radunski, S. Corsham, N. Cheong, N. Inagaki, N. Ban, D. Wenzel, D. Reinhardt, A. Zapf, S. Schweyer, F. Kosari, W. Klapper, L. Truemper and G. G. Wulf (2008). "Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration." *Leukemia* **22**(8): 1576-1586.

Chauhan, P. S., B. Bhushan, L. C. Singh, A. K. Mishra, S. Saluja, V. Mittal, D. K. Gupta and S. Kapur (2012). "Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy." *Exp Mol Pathol* **92**(1): 44-49.

Cheson, B. D., J. M. Bennett, K. J. Kopecky, T. Buchner, C. L. Willman, E. H. Estey, C. A. Schiffer, H. Dohner, M. S. Tallman, T. A. Lister, F. Lo-Coco, R. Willemze, A. Biondi, W. Hiddemann, R. A. Larson, B. Lowenberg, M. A. Sanz, D. R. Head, R. Ohno, C. D. Bloomfield, S. o. R. C. T. O. International Working Group for Diagnosis and L. Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid (2003). "Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia." *J Clin Oncol* **21**(24): 4642-4649.

Cheson, B. D., P. A. Cassileth, D. R. Head, C. A. Schiffer, J. M. Bennett, C. D. Bloomfield, R. Brunning, R. P. Gale, M. R. Grever, M. J. Keating and et al. (1990). "Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia." *J Clin Oncol* **8**(5): 813-819.

Damiani, D., M. Tiribelli, A. Michelutti, A. Geromin, M. Cavallin, D. Fabbro, A. Pianta, M. Malagola, G. Damante, D. Russo and R. Fanin (2010). "Fludarabine-based induction therapy does not overcome the negative effect of ABCG2 (BCRP) over-expression in adult acute myeloid leukemia patients." *Leuk Res* **34**(7): 942-945.

Daver, N., A. H. Wei, D. A. Pollyea, A. T. Fathi, P. Vyas and C. D. DiNardo (2020). "New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter." *Blood Cancer J* **10**(10): 107.

Del Principe, M. I., F. Buccisano, S. Soddu, L. Maurillo, M. Cefalo, A. Piciocchi, M. I. Consalvo, G. Paterno, C. Sarlo, E. De Bellis, A. Zizzari, G. De Angelis, D. Fraboni, M. Divona, M. T. Voso, G. Sconocchia, G. Del Poeta, F. Lo-Coco, W. Arcese, S. Amadori and A. Venditti (2018). "Involvement of central nervous system in adult patients with acute myeloid leukemia: Incidence and impact on outcome." *Semin Hematol* **55**(4): 209-214.

Di Giacomo, S., O. Briz, M. J. Monte, L. Sanchez-Vicente, L. Abete, E. Lozano, G. Mazzanti, A. Di Sotto and J. J. G. Marin (2019). "Chemosensitization of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by beta-caryophyllene oxide-induced inhibition of ABC export pumps." *Arch Toxicol* **93**(3): 623-634.

DiNardo, C. D., B. A. Jonas, V. Pullarkat, M. J. Thirman, J. S. Garcia, A. H. Wei, M. Konopleva, H. Dohner, A. Letai, P. Fenaux, E. Koller, V. Havelange, B. Leber, J. Esteve, J. Wang, V. Pejsa, R. Hajek, K. Porkka, A. Illes, D. Lavie, R. M. Lemoli, K. Yamamoto, S. S. Yoon, J. H. Jang, S. P. Yeh, M. Turgut, W. J. Hong, Y. Zhou, J. Potluri and K. W. Pratz (2020). "Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia." *N Engl J Med* **383**(7): 617-629.

DiNardo, C. D., J. Wang and K. W. Pratz (2020). "Azacitidine and Venetoclax in AML. Reply." *N Engl J Med* **383**(21): 2088-2089.

Dohner, H., E. Estey, D. Grimwade, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, R. A. Larson, R. L. Levine, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, H. F. Tien, A. H. Wei, B. Lowenberg and C. D. Bloomfield (2017). "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." *Blood* **129**(4): 424-447.

Dohner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Lowenberg, C. D. Bloomfield and L. European (2010). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet." *Blood* **115**(3): 453-474.

Dohner, H., A. H. Wei, F. R. Appelbaum, C. Craddock, C. D. DiNardo, H. Dombret, B. L. Ebert, P. Fenaux, L. A. Godley, R. P. Hasserjian, R. A. Larson, R. L. Levine, Y. Miyazaki, D. Niederwieser, G. Ossenkoppele, C. Rollig, J. Sierra, E. M. Stein, M. S. Tallman, H. F. Tien, J. Wang, A. Wierzbowska and B. Lowenberg (2022). "Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN." *Blood* **140**(12): 1345-1377.

Dohner, H., D. J. Weisdorf and C. D. Bloomfield (2015). "Acute Myeloid Leukemia." *N Engl J Med* **373**(12): 1136-1152.

Dombret, H., J. F. Seymour, A. Butrym, A. Wierzbowska, D. Selleslag, J. H. Jang, R. Kumar, J. Cavenagh, A. C. Schuh, A. Candoni, C. Recher, I. Sandhu, T. Bernal del Castillo, H. K. Al-Ali, G. Martinelli, J. Falantes, R. Noppeney, R. M. Stone, M. D. Minden, H. McIntyre, S. Songer, L. M. Lucy, C. L. Beach and H. Dohner (2015). "International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts." *Blood* **126**(3): 291-299.

Dores, G. M., S. S. Devesa, R. E. Curtis, M. S. Linet and L. M. Morton (2012). "Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007." *Blood* **119**(1): 34-43.

Doxani, C., M. Voulgarelis and E. Zintzaras (2013). "MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis." *Biomarkers* **18**(5): 425-435.

Drenberg, C. D., S. Hu, L. Li, D. R. Buelow, S. J. Orwick, A. A. Gibson, J. D. Schuetz, A. Sparreboom and S. D. Baker (2016). "ABCC4 Is a Determinant of Cytarabine-Induced Cytotoxicity and Myelosuppression." *Clin Transl Sci* **9**(1): 51-59.

Efferth, T., B. W. Futscher and R. Osieka (2001). "5-Azacytidine modulates the response of sensitive and multidrug-resistant K562 leukemic cells to cytostatic drugs." *Blood Cells Mol Dis* **27**(3): 637-648.

Efferth, T., J. P. Gillet, A. Sauerbrey, F. Zintl, V. Bertholet, F. de Longueville, J. Remacle and D. Steinbach (2006). "Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Mol Cancer Ther* **5**(8): 1986-1994.

Elwi, A. N., V. L. Damaraju, M. L. Kuzma, S. A. Baldwin, J. D. Young, M. B. Sawyer and C. E. Cass (2009). "Human concentrative nucleoside transporter 3 is a determinant of fludarabine transportability and cytotoxicity in human renal proximal tubule cell cultures." *Cancer Chemother Pharmacol* **63**(2): 289-301.

Escudier, B., T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R. M. Bukowski and T. S. Group (2007). "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma." *N Engl J Med* **356**(2): 125-134.

Falk, I. J., A. Fyrberg, E. Paul, H. Nahi, M. Hermanson, R. Rosenquist, M. Hoglund, L. Palmqvist, D. Stockelberg, Y. Wei, H. Green and K. Lotfi (2013). "Decreased survival in normal karyotype AML with single-nucleotide polymorphisms in genes encoding the AraC metabolizing enzymes cytidine deaminase and 5'-nucleotidase." *Am J Hematol* **88**(12): 1001-1006.

Fanciullino, R., L. Farnault, M. Donnette, D. C. Imbs, C. Roche, G. Venton, Y. Berda-Haddad, V. Ivanov, J. Ciccolini, L. Ouafik, B. Lacarelle and R. Costello (2018). "CDA as a predictive marker for life-threatening toxicities in patients with AML treated with cytarabine." *Blood Adv* **2**(5): 462-469.

Filipits, M., G. Pohl, T. Stranzl, R. W. Suchomel, R. J. Scheper, U. Jager, K. Geissler, K. Lechner and R. Pirker (1998). "Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia." *Blood* **91**(5): 1508-1513.

Frank, N. Y., A. Margaryan, Y. Huang, T. Schatton, A. M. Waaga-Gasser, M. Gasser, M. H. Sayegh, W. Sadee and M. H. Frank (2005). "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." *Cancer Res* **65**(10): 4320-4333.

Galmarini, C. M., E. Cros, K. Graham, X. Thomas, J. R. Mackey and C. Dumontet (2004). "5'-(3')-nucleotidase mRNA levels in blast cells are a prognostic factor in acute myeloid leukemia patients treated with cytarabine." *Haematologica* **89**(5): 617-619.

Galmarini, C. M., X. Thomas, F. Calvo, P. Rousselot, A. El Jafaari, E. Cros and C. Dumontet (2002). "Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients." *Leuk Res* **26**(7): 621-629.

Galmarini, C. M., X. Thomas, K. Graham, A. El Jafaari, E. Cros, L. Jordheim, J. R. Mackey and C. Dumontet (2003). "Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine." *Br J Haematol* **122**(1): 53-60.

Garciaz, S. and M. A. Hospital (2023). "FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Inhibitors in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: An Update on the Emerging Evidence and Safety Profile." *Onco Targets Ther* **16**: 31-45.

Geier, A., R. I. Macias, D. Bettinger, J. Weiss, H. Bantel, D. Jahn, R. Al-Abdulla and J. J. Marin (2017). "The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma." *Oncotarget* **8**(9): 15846-15857.

Giannoudis, A., A. Davies, C. M. Lucas, R. J. Harris, M. Pirmohamed and R. E. Clark (2008). "Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia." *Blood* **112**(8): 3348-3354.

Grant, S. (1998). "Ara-C: cellular and molecular pharmacology." *Adv Cancer Res* **72**: 197-233.

Grimwade, D., R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett and G. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working (2010). "Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials." *Blood* **116**(3): 354-365.

Guo, Y., K. Kock, C. A. Ritter, Z. S. Chen, M. Grube, G. Jedlitschky, T. Illmer, M. Ayres, J. F. Beck, W. Siegmund, G. Ehninger, V. Gandhi, H. K. Kroemer, G. D. Kruh and M. Schaich (2009). "Expression of ABCC-type nucleotide exporters in blasts of adult acute myeloid leukemia: relation to long-term survival." *Clin Cancer Res* **15**(5): 1762-1769.

Hartford, C. M., S. Duan, S. M. Delaney, S. Mi, E. O. Kistner, J. K. Lamba, R. S. Huang and M. E. Dolan (2009). "Population-specific genetic variants important in susceptibility to cytarabine arabinoside cytotoxicity." *Blood* **113**(10): 2145-2153.

Haugen, B. R., E. K. Alexander, K. C. Bible, G. M. Doherty, S. J. Mandel, Y. E. Nikiforov, F. Pacini, G. W. Randolph, A. M. Sawka, M. Schlumberger, K. G. Schuff, S. I. Sherman, J. A. Sosa, D. L. Steward, R. M. Tuttle and L. Wartofsky (2016). "2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer." *Thyroid* **26**(1): 1-133.

Herraez, E., E. Lozano, R. I. Macias, J. Vaquero, L. Bujanda, J. M. Banales, J. J. Marin and O. Briz (2013). "Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib." *Hepatology* **58**(3): 1065-1073.

Higashi, Y., J. Turzanski, M. Pallis and N. H. Russell (2000). "Contrasting in vitro effects for the combination of fludarabine, cytosine arabinoside (Ara-C) and granulocyte colony-stimulating factor (FLAG) compared with daunorubicin and Ara-C in P-glycoprotein-positive and P-glycoprotein-negative acute myeloblastic leukaemia." Br J Haematol **111**(2): 565-569.

Hofman, J., B. Malcekova, A. Skarka, E. Novotna and V. Wsol (2014). "Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3." Toxicol Appl Pharmacol **278**(3): 238-248.

Hubeek, I., R. W. Stam, G. J. Peters, R. Broekhuizen, J. P. Meijerink, E. R. van Wering, B. E. Gibson, U. Creutzig, C. M. Zwaan, J. Cloos, D. J. Kuik, R. Pieters and G. J. Kaspers (2005). "The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia." Br J Cancer **93**(12): 1388-1394.

Hummel-Eisenbeiss, J., A. Hascher, P. A. Hals, M. L. Sandvold, C. Muller-Tidow, F. Lyko and M. Rius (2013). "The role of human equilibrative nucleoside transporter 1 on the cellular transport of the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and CP-4200 in human leukemia cells." Mol Pharmacol **84**(3): 438-450.

Jaiswal, S., P. Fontanillas, J. Flannick, A. Manning, P. V. Grauman, B. G. Mar, R. C. Lindsley, C. H. Mermel, N. Burt, A. Chavez, J. M. Higgins, V. Moltchanov, F. C. Kuo, M. J. Kluk, B. Henderson, L. Kinnunen, H. A. Koistinen, C. Ladenvall, G. Getz, A. Correa, B. F. Banahan, S. Gabriel, S. Kathiresan, H. M. Stringham, M. I. McCarthy, M. Boehnke, J. Tuomilehto, C. Haiman, L. Groop, G. Atzmon, J. G. Wilson, D. Neuberg, D. Altshuler and B. L. Ebert (2014). "Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes." N Engl J Med **371**(26): 2488-2498.

Jakobsen, I., M. Sundkvist, N. Bjorn, H. Green and K. Lotfi (2022). "Early changes in gene expression profiles in AML patients during induction chemotherapy." BMC Genomics **23**(1): 752.

Jongen-Lavrencic, M., T. Grob, D. Hanekamp, F. G. Kavelaars, A. Al Hinai, A. Zeilemaker, C. A. J. Erpelinck-Verschueren, P. L. Gradowska, R. Meijer, J. Cloos, B. J. Biemond, C. Graux, M. van Marwijk Kooy, M. G. Manz, T. Pabst, J. R. Passweg, V. Havelange, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanders, G. J. Schuurhuis, B. Lowenberg and P. J. M. Valk (2018). "Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **378**(13): 1189-1199.

Kantarjian, H. M., X. G. Thomas, A. Dmoszynska, A. Wierzbowska, G. Mazur, J. Mayer, J. P. Gau, W. C. Chou, R. Buckstein, J. Cermak, C. Y. Kuo, A. Oriol, F. Ravandi, S. Faderl, J. Delaunay, D. Lysak, M. Minden and C. Arthur (2012). "Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **30**(21): 2670-2677.

Khoury, J. D., E. Solary, O. Abla, Y. Akkari, R. Alaggio, J. F. Apperley, R. Bejar, E. Berti, L. Busque, J. K. C. Chan, W. Chen, X. Chen, W. J. Chng, J. K. Choi, I. Colmenero, S. E. Coupland, N. C. P. Cross, D. De Jong, M. T. Elghetany, E. Takahashi, J. F. Emile, J. Ferry, L. Fogelstrand, M. Fontenay, U. Germing, S. Gujral, T. Haferlach, C. Harrison, J. C. Hodge, S. Hu, J. H. Jansen, R. Kanagal-Shamanna, H. M. Kantarjian, C. P. Kratz, X. Q. Li, M. S. Lim, K. Loeb, S. Loghavi, A. Marcogliese, S. Meshinchi, P. Michaels, K. N. Naresh, Y. Natkunam, R. Nejati, G. Ott, E. Padron, K. P. Patel, N. Patkar, J. Picarsic, U. Platzbecker, I. Roberts, A. Schuh, W. Sewell, R. Siebert, P. Tembhare, J. Tyner, S. Verstovsek, W. Wang, B. Wood, W. Xiao, C. Yeung and A. Hochhaus (2022). "The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms." Leukemia **36**(7): 1703-1719.

King, K. M., V. L. Damaraju, M. F. Vickers, S. Y. Yao, T. Lang, T. E. Tackaberry, D. A. Mowles, A. M. Ng, J. D. Young and C. E. Cass (2006). "A comparison of the transportability, and its role in cytotoxicity, of clofarabine, cladribine, and fludarabine by recombinant human nucleoside transporters produced in three model expression systems." Mol Pharmacol **69**(1): 346-353.

Kohlmann, W. and J. D. Schiffman (2016). "Discussing and managing hematologic germ line variants." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2016**(1): 309-315.

Kurata, M., S. K. Rathe, N. J. Bailey, N. K. Aumann, J. M. Jones, G. W. Veldhuijzen, B. S. Moriarity and D. A. Largaespada (2016). "Using genome-wide CRISPR library screening with library resistant DCK to find new sources of Ara-C drug resistance in AML." Sci Rep **6**: 36199.

Lagas, J. S., R. A. van Waterschoot, R. W. Sparidans, E. Wagenaar, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2010). "Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation." Mol Cancer Ther **9**(2): 319-326.

Lalic, H., V. Lukinovic-Skudar, H. Banfic and D. Visnjic (2012). "Rapamycin enhances dimethyl sulfoxide-mediated growth arrest in human myelogenous leukemia cells." Leuk Lymphoma **53**(11): 2253-2261.

Lamba, J. K. (2009). "Genetic factors influencing cytarabine therapy." Pharmacogenomics **10**(10): 1657-1674.

Lo-Coco, F., G. Avvisati, M. Vignetti, C. Thiede, S. M. Orlando, S. Iacobelli, F. Ferrara, P. Fazi, L. Cicconi, E. Di Bona, G. Specchia, S. Sica, M. Divona, A. Levis, W. Fiedler, E. Cerqui, M. Breccia, G. Fioritoni, H. R. Salih, M. Cazzola, L. Melillo, A. M. Carella, C. H. Brandts, E. Morra, M. von Lilienfeld-Toal, B. Hertenstein, M. Wattad, M. Lubbert, M. Hanel, N. Schmitz, H. Link, M. G. Kropp, A. Rambaldi, G. La Nasa, M. Luppi, F. Ciceri, O. Finizio, A. Venditti, F. Fabbiano, K. Dohner, M. Sauer, A. Ganser, S. Amadori, F. Mandelli, H. Dohner, G. Ehninger, R. F. Schlenk, U. Platzbecker, d. A. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche, G. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study and L. Study Alliance (2013). "Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia." N Engl J Med **369**(2): 111-121.

Lowenberg, B., T. Pabst, E. Vellenga, W. van Putten, H. C. Schouten, C. Graux, A. Ferrant, P. Sonneveld, B. J. Biemond, A. Gratwohl, G. E. de Greef, L. F. Verdonck, M. R. Schaafsma, M. Gregor, M. Theobald, U. Schanz, J. Maertens, G. J. Ossenkoppele, H.-O. Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for and G. Swiss Group for Clinical Cancer Research Collaborative (2011). "Cytarabine dose for acute myeloid leukemia." N Engl J Med **364**(11): 1027-1036.

Llovet, J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J. L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J. F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix and S. I. S. Group (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **359**(4): 378-390.

Macias, R. I. R., A. Sanchez-Martin, G. Rodriguez-Macias, L. I. Sanchez-Abarca, E. Lozano, E. Herraez, M. D. Odero, J. L. Diez-Martin, J. J. G. Marin and O. Briz (2018). "Role of drug transporters in the sensitivity of acute myeloid leukemia to sorafenib." Oncotarget **9**(47): 28474-28485.

Mahadevan, D. and A. F. List (2004). "Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies." Blood **104**(7): 1940-1951.

Mahfouz, R. Z., A. Jankowska, Q. Ebrahim, X. Gu, V. Visconte, A. Tabarrokhi, P. Terse, J. Covey, K. Chan, Y. Ling, K. J. Engelke, M. A. Sekeres, R. Tiu, J. Maciejewski, T. Radivoyevitch and Y. Sauntharajah (2013). "Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy." Clin Cancer Res **19**(4): 938-948.

Marin, J. J. (2012). "Plasma membrane transporters in modern liver pharmacology." Scientifica (Cairo) **2012**: 428139.

Marin, J. J., O. Briz, M. J. Monte, A. G. Blazquez and R. I. Macias (2012). "Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs." Curr Cancer Drug Targets **12**(4): 402-438.

Marin, J. J., O. Briz, G. Rodriguez-Macias, J. L. Diez-Martin and R. I. Macias (2016). "Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia." Blood Rev **30**(1): 55-64.

Marin, J. J., M. J. Monte, A. G. Blazquez, R. I. Macias, M. A. Serrano and O. Briz (2014). "The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy." Acta Pharmacol Sin **35**(1): 1-10.

Marin, J. J. G., R. I. R. Macias, M. J. Monte, M. R. Romero, M. Asensio, A. Sanchez-Martin, C. Cives-Losada, A. G. Temprano, R. Espinosa-Escudero, M. Reviejo, L. H. Bohorquez and O. Briz (2020). "Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma." Cancers (Basel) **12**(6).

Mayer, R. J., R. B. Davis, C. A. Schiffer, D. T. Berg, B. L. Powell, P. Schulman, G. A. Omura, J. O. Moore, O. R. McIntyre and E. Frei, 3rd (1994). "Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B." N Engl J Med **331**(14): 896-903.

McNerney, M. E., L. A. Godley and M. M. Le Beau (2017). "Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide." Nat Rev Cancer **17**(9): 513-527.

Medeiros, B. C., M. Othus, M. Fang, D. Roulston and F. R. Appelbaum (2010). "Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience." Blood **116**(13): 2224-2228.

Megias-Vericat, J. E., L. Rojas, M. J. Herrero, V. Boso, P. Montesinos, F. Moscardo, J. L. Poveda, M. A. Sanz and S. F. Alino (2015). "Influence of ABCB1 polymorphisms upon the effectiveness of standard treatment for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis of observational studies." Pharmacogenomics J **15**(2): 109-118.

Molina-Arcas, M., B. Bellosillo, F. J. Casado, E. Montserrat, J. Gil, D. Colomer and M. Pastor-Anglada (2003). "Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **101**(6): 2328-2334.

Mrozek, K. (2022). "Molecular cytogenetics in acute myeloid leukemia in adult patients: practical implications." Pol Arch Intern Med **132**(7-8).

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

NCCN-v3.2022 (2022). "National Comprehensive Cancer Network. Acute Myeloid Leukemia (version 3.2022). ."

Neubauer, A., H. Sauer and G. Valet (1987). "Cytostatic drug testing in human leukemias by means of multiparametric flow cytometry." Blut **55**(5): 433-445.

Noguchi, K., K. Katayama and Y. Sugimoto (2014). "Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics." Pharmgenomics Pers Med **7**: 53-64.

O'Brien, M., G. D. Kruh and K. D. Tew (2000). "The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance." J Pharmacol Exp Ther **294**(2): 480-487.

Pallis, M., R. Hills, P. White, M. Grundy, N. Russell and A. Burnett (2011). "Analysis of the interaction of induction regimens with p-glycoprotein expression in patients with acute myeloid leukaemia: results from the MRC AML15 trial." Blood Cancer J **1**(6): e23.

Papaemmanuil, E., H. Dohner and P. J. Campbell (2016). "Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **375**(9): 900-901.

Pastor-Anglada, M. and S. Perez-Torras (2018). "Emerging Roles of Nucleoside Transporters." Front Pharmacol **9**: 606.

Pisco, A. O., D. A. Jackson and S. Huang (2014). "Reduced Intracellular Drug Accumulation in Drug-Resistant Leukemia Cells is Not Only Solely Due to MDR-Mediated Efflux but also to Decreased Uptake." Front Oncol **4**: 306.

Porro, A., N. Iraci, S. Soverini, D. Diolaiti, S. Gherardi, C. Terragna, S. Durante, E. Valli, T. Kalebic, R. Bernardoni, C. Perrod, M. Haber, M. D. Norris, M. Bacarani, G. Martinelli and G. Perini (2011). "c-MYC oncoprotein dictates transcriptional profiles of ATP-binding cassette transporter genes in chronic myelogenous leukemia CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Mol Cancer Res* **9**(8): 1054-1066.

Qin, T., J. Jelinek, J. Si, J. Shu and J. P. Issa (2009). "Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines." *Blood* **113**(3): 659-667.

Rollig, C., H. Serve, R. Noppeney, M. Hanoun, U. Krug, C. D. Baldus, C. H. Brandts, V. Kunzmann, H. Einsele, A. Kramer, C. Muller-Tidow, K. Schafer-Eckart, A. Neubauer, A. Burchert, A. Giagounidis, S. W. Krause, A. Mackensen, W. Aulitzky, R. Herbst, M. Hanel, N. Frickhofen, J. Kullmer, U. Kaiser, A. Kiani, H. Link, T. Geer, A. Reichle, C. Junghanss, R. Repp, A. Meinhardt, H. Durk, I. M. Klut, M. Bornhauser, M. Schaich, S. Parmentier, M. Gorner, C. Thiede, M. von Bonin, U. Platzbecker, J. Schetelig, M. Kramer, W. E. Berdel, G. Ehninger and L. Study Alliance (2021). "Sorafenib or placebo in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia: long-term follow-up of the randomized controlled SORAML trial." *Leukemia* **35**(9): 2517-2525.

Roof, C., N. Dybowski, A. Sekora, S. Mueller, G. Knuebel, A. Tebbe, H. Murua Escobar, K. Godl, C. Junghanss and C. Schaab (2017). "Phosphoproteome Analysis Reveals Differential Mode of Action of Sorafenib in Wildtype and Mutated FLT3 Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells." *Mol Cell Proteomics* **16**(7): 1365-1376.

Rozovski, U., M. Ohanian, F. Ravandi, G. Garcia-Manero, S. Faderl, S. Pierce, J. Cortes and Z. Estrov (2015). "Incidence of and risk factors for involvement of the central nervous system in acute myeloid leukemia." *Leuk Lymphoma* **56**(5): 1392-1397.

Sant, M., C. Allemani, C. Tereanu, R. De Angelis, R. Capocaccia, O. Visser, R. Marcos-Gragera, M. Maynadie, A. Simonetti, J. M. Lutz, F. Berrino and H. W. Group (2010). "Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project." *Blood* **116**(19): 3724-3734.

Sanz, M. A., P. Fenaux, M. S. Tallman, E. H. Estey, B. Lowenberg, T. Naoe, E. Lengfelder, H. Dohner, A. K. Burnett, S. J. Chen, V. Mathews, H. Iland, E. Rego, H. Kantarjian, L. Ades, G. Avvisati, P. Montesinos, U. Platzbecker, F. Ravandi, N. H. Russell and F. Lo-Coco (2019). "Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet." *Blood* **133**(15): 1630-1643.

Schaich, M., S. Soucek, C. Thiede, G. Ehninger, T. Illmer and S. A. S. Group (2005). "MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia." *Br J Haematol* **128**(3): 324-332.

Schlenk, R. F., D. Weber, W. Fiedler, H. R. Salih, G. Wulf, H. Salwender, T. Schroeder, T. Kindler, M. Lubbert, D. Wolf, J. Westermann, D. Kraemer, K. S. Gotze, H. A. Horst, J. Krauter, M. Girschikofsky, M. Ringhoffer, T. Sudhoff, G. Held, H. G. Derigs, R. Schroers, R. Greil, M. Griesshammer, E. Lange, A. Burchardt, U. Martens, B. Hertenstein, L. Marretta, M. Heuser, F. Thol, V. I. Gaidzik, W. Herr, J. Krzykalla, A. Benner, K. Dohner, A. Ganser, P. Paschka, H. Dohner and A. M. L. S. G. German-Austrian (2019). "Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD." *Blood* **133**(8): 840-851.

Schuurhuis, G. J., M. Heuser, S. Freeman, M. C. Bene, F. Buccisano, J. Cloos, D. Grimwade, T. Haferlach, R. K. Hills, C. S. Hourigan, J. L. Jorgensen, W. Kern, F. Lacombe, L. Maurillo, C. Preudhomme, B. A. van der Reijden, C. Thiede, A. Venditti, P. Vyas, B. L. Wood, R. B. Walter, K. Dohner, G. J. Roboz and G. J. Ossenkoppele (2018). "Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party." *Blood* **131**(12): 1275-1291.

Schwartz, S., A. Heinecke, M. Zimmermann, U. Creutzig, C. Schoch, J. Harbott, C. Fonatsch, H. Loffler, T. Buchner, W. D. Ludwig and E. Thiel (1999). "Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance." *Leuk Lymphoma* **34**(1-2): 85-94.

- SEER (2020). "Surveillance, Epidemiology, and End Results Program: Cancer Stat Facts: Leukemia — Acute Myeloid Leukemia (AML). Bethesda, Md: National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program. Disponible online. Ultimo acceso 23 de noviembre de 2022."
- Shallis, R. M., R. Wang, A. Davidoff, X. Ma and A. M. Zeidan (2019). "Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges." *Blood Rev* **36**: 70-87.
- Shi, P., J. Zha, X. Guo, F. Chen, Z. Fan, F. Huang, F. Meng, X. Liu, R. Feng and B. Xu (2013). "Idarubicin is superior to daunorubicin in remission induction of de novo acute myeloid leukemia patients with high MDR1 expression." *Pharmacogenomics* **14**(1): 17-23.
- Shibayama, Y., K. Nakano, H. Maeda, M. Taguchi, R. Ikeda, M. Sugawara, K. Iseki, Y. Takeda and K. Yamada (2011). "Multidrug resistance protein 2 implicates anticancer drug-resistance to sorafenib." *Biol Pharm Bull* **34**(3): 433-435.
- Shimony, S., M. Stahl and R. M. Stone (2023). "Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management." *Am J Hematol* **98**(3): 502-526.
- Shman, T. V., U. U. Fedasenka, V. P. Savitski and O. V. Aleinikova (2008). "CD34+ leukemic subpopulation predominantly displays lower spontaneous apoptosis and has higher expression levels of Bcl-2 and MDR1 genes than CD34- cells in childhood AML." *Ann Hematol* **87**(5): 353-360.
- Short, N. J., M. E. Rytting and J. E. Cortes (2018). "Acute myeloid leukaemia." *Lancet* **392**(10147): 593-606.
- Slapak, C. A., J. M. Lecerf, J. C. Daniel and S. B. Levy (1992). "Energy-dependent accumulation of daunorubicin into subcellular compartments of human leukemia cells and cytoplasts." *J Biol Chem* **267**(15): 10638-10644.
- Sorrer, M. L., B. E. Storer, A. T. Fathi, A. T. Gerds, B. C. Medeiros, P. Shami, A. M. Brunner, M. A. Sekeres, S. Mukherjee, E. Pena, M. Elsayy, S. Wardyn, J. Whitten, R. Moore, P. S. Becker, J. S. McCune, F. R. Appelbaum and E. H. Estey (2017). "Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia-Composite Model to Estimate Risks of Mortality." *JAMA Oncol* **3**(12): 1675-1682.
- Stam, R. W., M. M. van den Heuvel-Eibrink, M. L. den Boer, M. E. Ebus, G. E. Janka-Schaub, J. D. Allen and R. Pieters (2004). "Multidrug resistance genes in infant acute lymphoblastic leukemia: Ara-C is not a substrate for the breast cancer resistance protein." *Leukemia* **18**(1): 78-83.
- Stefanko, E., J. Rybka, B. Jazwiec, O. Haus, S. Stapor, K. Kuliczowski and T. Wrobel (2017). "Significance of OCT1 Expression in Acute Myeloid Leukemia." *Pathol Oncol Res* **23**(3): 665-671.
- Steinbach, D., S. Furchtbar, W. Sell, J. Lengemann, J. Hermann, F. Zintl and A. Sauerbrey (2003). "Contrary to adult patients, expression of the multidrug resistance gene (MDR1) fails to define a poor prognostic group in childhood AML." *Leukemia* **17**(2): 470-471.
- Steinbach, D., J. P. Gillet, A. Sauerbrey, B. Gruhn, K. Dawczynski, V. Bertholet, F. de Longueville, F. Zintl, J. Remacle and T. Efferth (2006). "ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia." *Clin Cancer Res* **12**(14 Pt 1): 4357-4363.
- Stone, R. M., S. J. Mandrekar, B. L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C. D. Bloomfield, C. Thiede, T. W. Prior, K. Dohner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R. B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, J. Krauter, R. F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R. A. Larson and H. Dohner (2017). "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." *N Engl J Med* **377**(5): 454-464.
- Su, M., Y. T. Chang, D. Hernandez, R. J. Jones and G. Ghiaur (2019). "Regulation of drug metabolizing enzymes in the leukaemic bone marrow microenvironment." *J Cell Mol Med* **23**(6): 4111-4117.

Suvannasankha, A., H. Minderman, K. L. O'Loughlin, T. Nakanishi, W. R. Greco, D. D. Ross and M. R. Baer (2004). "Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function." Leukemia **18**(7): 1252-1257.

Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein and J. Thiele (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.

Swift, B., N. Nebot, J. K. Lee, T. Han, W. R. Proctor, D. R. Thakker, D. Lang, M. Radtke, M. J. Gnoth and K. L. Brouwer (2013). "Sorafenib hepatobiliary disposition: mechanisms of hepatic uptake and disposition of generated metabolites." Drug Metab Dispos **41**(6): 1179-1186.

Tallman, M. S., E. S. Wang, J. K. Altman, F. R. Appelbaum, V. R. Bhatt, D. Bixby, S. E. Coutre, M. De Lima, A. T. Fathi, M. Fiorella, J. M. Foran, A. C. Hall, M. Jacoby, J. Lancet, T. W. LeBlanc, G. Mannis, G. Marcucci, M. G. Martin, A. Mims, M. R. O'Donnell, R. Olin, D. Peker, A. Perl, D. A. Pollyea, K. Pratz, T. Prebet, F. Ravandi, P. J. Shami, R. M. Stone, S. A. Strickland, M. Wieduwilt, K. M. Gregory, Ocn, L. Hammond and N. Ogba (2019). "Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." J Natl Compr Canc Netw **17**(6): 721-749.

Tandia, M., A. Mhiri, B. Paule, R. Saffroy, V. Cailliez, G. Noe, R. Farinotti and L. Bonhomme-Faivre (2017). "Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study." Cancer Chemother Pharmacol **79**(4): 759-766.

Tang, S. C., N. de Vries, R. W. Sparidans, E. Wagenaar, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2013). "Impact of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) gene dosage on plasma pharmacokinetics and brain accumulation of dasatinib, sorafenib, and sunitinib." J Pharmacol Exp Ther **346**(3): 486-494.

Tefferi, A. and A. Pardanani (2015). "Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review." JAMA Oncol **1**(1): 97-105.

Thol, F., R. F. Schlenk, M. Heuser and A. Ganser (2015). "How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia." Blood **126**(3): 319-327.

Tomonari, T., S. Takeishi, T. Taniguchi, T. Tanaka, H. Tanaka, S. Fujimoto, T. Kimura, K. Okamoto, H. Miyamoto, N. Muguruma and T. Takayama (2016). "MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma." Oncotarget **7**(6): 7207-7215.

van den Heuvel-Eibrink, M. M., B. van der Holt, A. K. Burnett, W. U. Knauf, M. F. Fey, G. E. Verhoef, E. Vellenga, G. J. Ossenkoppele, B. Lowenberg and P. Sonneveld (2007). "CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age." Ann Hematol **86**(5): 329-337.

van den Heuvel-Eibrink, M. M., E. A. Wiemer, A. Prins, J. P. Meijerink, P. J. Vossebeld, B. van der Holt, R. Pieters and P. Sonneveld (2002). "Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML)." Leukemia **16**(5): 833-839.

van der Kolk, D. M., E. G. de Vries, M. Muller and E. Vellenga (2002). "The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia." Leuk Lymphoma **43**(4): 685-701.

Wakita, S., M. Sakaguchi, I. Oh, S. Kako, T. Toya, Y. Najima, N. Doki, J. Kanda, J. Kuroda, S. Mori, A. Satake, K. Usuki, T. Ueki, N. Uoshima, Y. Kobayashi, E. Kawata, K. Tajika, Y. Nagao, K. Shono, M. Shibusawa, J. Tadokoro, K. Kayamori, M. Hagihara, H. Uchiyama, N. Uchida, Y. Kubota, S. Kimura, H. Nagoshi, T. Ichinohe, S. Kurosawa, S. Motomura, A. Hashimoto, H. Muto, E. Sato, M. Ogata, K. Mitsuhashi, J. Ando, A. Marumo, I. Omori, Y. Fujiwara, K. Terada, S. Yui, K. Arai, T. Kitano, M. Miyata, A. Kurosawa, A. Mizoguchi, N. Komatsu, T. Fukuda, K. Ohashi, Y. Kanda, K. Inokuchi and H. Yamaguchi (2022). "Prognostic impact of CEBPA bZIP domain mutation in acute myeloid leukemia." Blood Adv **6**(1): 238-247.

Wang, L., A. Giannoudis, S. Lane, P. Williamson, M. Pirmohamed and R. E. Clark (2008). "Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia." Clin Pharmacol Ther **83**(2): 258-264.

Wood, P., R. Burgess, A. MacGregor and J. A. Yin (1994). "P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival." Br J Haematol **87**(3): 509-514.

Wu, B., Z. J. Mao, Z. Wang, P. Wu, H. Huang, W. Zhao, L. Zhang, Z. Zhang, H. Yin, R. P. Gale and B. Yin (2021). "Deoxycytidine Kinase (DCK) Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Resistant to Cytarabine." Acta Haematol **144**(5): 534-541.

Yamakawa, Y., A. Hamada, T. Shuto, M. Yuki, T. Uchida, H. Kai, T. Kawaguchi and H. Saito (2011). "Pharmacokinetic impact of SLCO1A2 polymorphisms on imatinib disposition in patients with chronic myeloid leukemia." Clin Pharmacol Ther **90**(1): 157-163.

Yang, M., W. Li, D. Fan, Y. Yan, X. Zhang, Y. Zhang and D. Xiong (2012). "Expression of ABCB5 gene in hematological malignances and its significance." Leuk Lymphoma **53**(6): 1211-1215.

Yates, J. W., H. J. Wallace, Jr., R. R. Ellison and J. F. Holland (1973). "Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia." Cancer Chemother Rep **57**(4): 485-488.

Zhang, W., M. Konopleva, V. R. Ruvolo, T. McQueen, R. L. Evans, W. G. Bornmann, J. McCubrey, J. Cortes and M. Andreeff (2008). "Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway." Leukemia **22**(4): 808-818.

Zhao, J. C., S. Agarwal, H. Ahmad, K. Amin, J. P. Bewersdorf and A. M. Zeidan (2022). "A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia." Blood Rev **52**: 100905.

Zheng, R., M. Levis, O. Piloto, P. Brown, B. R. Baldwin, N. C. Gorin, M. Beran, Z. Zhu, D. Ludwig, D. Hicklin, L. Witte, Y. Li and D. Small (2004). "FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells." Blood **103**(1): 267-274.

Zimmerman, E. I., S. Hu, J. L. Roberts, A. A. Gibson, S. J. Orwick, L. Li, A. Sparreboom and S. D. Baker (2013). "Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide." Clin Cancer Res **19**(6): 1458-1466.

