

ARTÍCULO ORIGINAL

Expresión del gen de resistencia a multidrogas (*MDR-1*) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica

*Expression of the gene to multidrug resistance (*MOR-1*) in patients with acute myeloblastic leukemia*

Irma Olarte-Carrillo, Enrique Miranda-Peralta, Alejandro Lopez-Lopez, Christian Ramos-Peñaflie, Jorge Zamora-Dominguez, Etta Rozen-Fuller, Juan Julio Kassack-Ipiña, Mario Gutiérrez-Romero, Juan Collazo-Jaloma, Adolfo Martínez-Tovar

Resumen

Introducción: El tratamiento actual de la leucemia aguda consiste esencialmente en un intensivo régimen de quimioterapia. Un factor de gran importancia para la respuesta al tratamiento es la presencia del gen de resistencia a multidrogas (*MDR-1*). Este gen se ha detectado en diferentes enfermedades neoplásicas y constituye la principal causa de quimioresistencia a diferentes fármacos.

Objetivo: Evaluar la expresión del gen *MDR-1* en pacientes con leucemia aguda mieloblástica que ingresaron al servicio de Hematología.

Métodos: La expresión del gen *MDR-1* fue analizada a nivel de mensajero por medio de la RT-PCR. Se correlacionó estadísticamente la expresión del gen *MDR-1* con factores que influyen en el pronóstico del paciente.

Resultados: Se encontró expresión del gen *MDR-1* en el 27.3% (6/22) de los pacientes. En el análisis estadístico, se encontró correlación ($p = 0.009$) de la expresión del *MDR-1* con la actividad del padecimiento de base posterior al tratamiento de Inducción (leucemia refractaria).

Conclusión: La resistencia celular a las drogas quimioterapéuticas, representa en la actualidad, la principal causa de falla en el tratamiento de la mayoría de las enfermedades onco-hematológicas por lo que es de gran importancia identificar el gen *MDR-1* en la mayoría de los padecimientos hematológicos para mejorar las estrategias terapéuticas.

Palabras clave: MDR-1; Leucemia; RT-PCR; LAM; ATP; México.

Abstract

Introduction: Current treatment of acute leukemia is essentially an intensive chemotherapy regimen. A major factor for response to treatment is the presence of gene the expression of the multidrug-response gene (*MDR-1*). This gene has been detected in various malignancies and is the main cause of resistance to chemotherapy.

Objective: Evaluate the expression of *MDR-1* gene in patients with acute myeloid leukemia admitted to the hematology department.

Methods: The expression of the *MDR-1* gene was analyzed by RT-PCR. Was correlated the expression of the *MDR-1* gene with factors that could influence in the prognosis of patients.

Results: Our results showed that the expression of the *MDR-1* gene was around the 27.3% (6/22). There was a statistical correlation between the *MDR-1* gene and the presence of refractory leukemia $p = 0.009$.

Conclusion: The chemotherapy resistance is now the leading cause of treatment failure, and this is of great importance to evaluate the *MDR-1* gene expression in most of the oncological diseases in order to improve the therapeutic strategies.

Keywords: MDR-1; Leukemia; ATP; RT-PCR; Mexico.

» Introducción

El gen *MDR-1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, codifica para una proteína de 170 kDa, también conocida como glicoproteína P (gP).^{1,2} Este gen forma parte de una familia que tiene dos miembros en los humanos (*MDR1*, *MDR2/3*).^{2,3} La glicoproteína pertenece a la superfamilia de proteínas ABC (casete de unión de ATP) especializadas en el transporte celular dependiente de energía, que participa en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas y movilización de iones y péptidos.¹⁻⁴ La gP está compuesta por una cadena de aproximadamente 1280 residuos de aminoácidos con dos mitades homólogas y 12 dominios transmembranales.¹⁻³ Presenta dos zonas de unión al ATP ubicadas en la parte citoplasmática, un sitio de glucosilación entre el primero y el segundo dominio transmembranal y varios sitios de fosforilación. Se especula que las drogas pasan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembranal y que la salida de sustancias requieren un cambio conformacional de la proteína dependiente de energía.^{5,6} La gP constituye un sistema de desintoxicación natural que se expresa en varios tejidos normales, como hígado, intestino delgado, riñón, placenta, células endoteliales del sistema nervioso central y testículo.⁷ La mayoría de los sustratos antitumorales de la gP son los alcaloides de la

Vinca como lo son la vincristina y la vinblasina, atraciclinas como daunorrubicina y doxorrubicina, las epipodofilotoxinas como el etopósido y tenopósido y más recientemente los Inhibidores de cinasa de tirosina.^{2,3} La expresión de este gen se ha observado en diferentes neoplasias como el sarcoma indiferenciado,⁸ carcinoma hepatocelular,⁹⁻¹¹ linfoma nasal de células T,¹² cáncer mamario,^{13,14} neoplasias hipofisiarias,¹⁵ cáncer de células germinales¹⁶ y leucemias,^{17,18} siendo en gran medida, la responsable de la respuesta al tratamiento. En las leucemias agudas, diversos factores se han relacionado con la supervivencia y éxito del tratamiento; los principales son: la edad al diagnóstico, la cifra inicial de leucocitos,¹⁹ el inmunofenotipo, las diversas alteraciones citogenéticas y moleculares,²⁰ el género y, en especial, la respuesta al esquema de inducción a la remisión. Este último factor depende en gran medida de la presencia o ausencia de la expresión de los genes de resistencia a multidrogas.²¹⁻²³ En las leucemias agudas tanto mieloides (LAM) como linfoides (LLA), la expresión del gen *MDR-1* se ha asociado a una falla al tratamiento de inducción y por ende a una menor tasa de supervivencia.^{1,5,17,24} La frecuencia de expresión en LAM al diagnóstico es cercana a 33%, sin embargo en la recaída, se ha informado hasta de 40%. En el caso de LAL al diagnóstico, no se ha informado la presencia de este gen, sin embargo ante la recaída, la frecuencia es en promedio de 35%.²⁵ Actualmente se desconocen los factores que

propician el aumento en la expresión de este gen, sin embargo su sobre-expresión en pacientes en recaída, es un indicativo para un pronóstico desfavorable. La frecuencia de expresión de este gen en la población mexicana se desconoce y no existe algún estudio molecular que relacione su expresión, con la respuesta al tratamiento. Es por eso que nuestro grupo de trabajo analizó la expresión del gen *MDR-1* por medio de técnicas de biología molecular al diagnóstico en pacientes con leucemia aguda mieloblástica del Hospital General de México.

» Métodos

Se realizó un estudio de tipo experimental, prospectivo y longitudinal en el periodo comprendido de enero de 2008 a enero de 2009 en el Servicio de Hematología del departamento de Biología molecular U-103 y U-204. La realización de esta investigación fue aprobada por los Comités de Investigación y de Ética de la Institución. Se incluyeron en el estudio pacientes con diagnóstico de LAM de *novo*, de independientemente del sexo, a los que se les realizó la toma de muestra de sangre periférica previa firma del consentimiento informado. El diagnóstico de LAM se realizó mediante los criterios de la Asociación Franco-Américo-Británica y con apoyo mediante inmunofenotipo y citoquímica. El seguimiento de los pacientes se realizó por medio de las consultas subsecuentes y los datos clínicos se recabaron del archivo clínico.

Protocolo de tratamiento: Todos los pacientes iniciaron tratamiento con base en el protocolo institucional 3 + 7, que consiste en la administración de citarabina (Ara C) a dosis de 100 mg/m² en infusión continua de 24 horas durante siete días y daunorrubicina a dosis de 60mg/m² en bolo durante los primeros tres días de quimioterapia; en caso de no contar con daunorrubicina, se consideró la administración de doxorrubicina o epirrubicina. En caso de presentarse una leucemia refractaria se consideró el inicio de un esquema de rescate.

Metodología: Entre las principales variables consideradas, se incluyeron la edad, género, cifra inicial de leucocitos, respuesta al tratamiento de inducción (protocolo institucional 3 + 7), buscando una correlación con la expresión del gen *MDR-1* y parámetros clínicos.

Líneas celulares: Se utilizaron las líneas celulares K562 (leucemia mieloide crónica), U937 (linfoma histiocítico), HL-60 (leucemia aguda promielocítica), Jurkat (leucemia aguda linfoblástica de células

T) y Raji (linfoma de Burkitt). Se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratorios, Logan, UT), penicilina/estreptomicina 1% y 2mercaptoetanol 50uM (Gibco BRL, Grand Island, NY).

Células leucémicas de pacientes: Se colectaron muestras de médula ósea de pacientes con LAM, previa firma del consentimiento informado. Las muestras fueron obtenidas con un tubo heparinizado y centrifugadas utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway), obteniéndose células mononucleares.

RT-PCR: La extracción del RNA celular total por medio del reactivo de Trizol (Life Technologies, Paisley, UK) y 1ug de RNA fue utilizado para la síntesis de cDNA por medio de la MMLV (Life Technologies, Paisley, UK).

La amplificación de PCR fue realizada con los primers *MDR-1F* 5'- AAA GCG ACT GAA TGT TCA GT - 3' y *MDR-1 R* 5'- TCT GCA TTC TGG ATG GTG G - 3. El RNA de la línea celular K562 y HL-60 fue usado como control positivo y negativo respectivamente. Cada cDNA fue probado por PCR usando primers específicos para el gen *GADPH* (Gliceraldeido 3- fosfato deshidrogenasa). La reacción de PCR fue realizada por 35 ciclos: un minuto a 94°C, un minuto a 55°C, un minuto a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa a 1.5% teñido con bromuro de etidio.

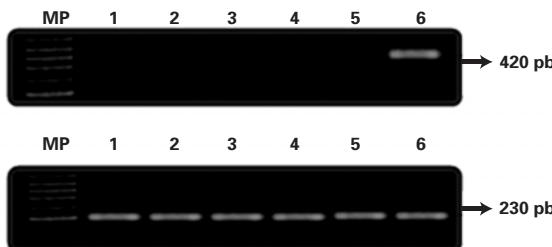
Análisis Estadístico: El método estadístico utilizado fue el de *Ji cuadrada*, prueba exacta de Fisher y la prueba de Mann-Whitney; considerándose significativo un nivel de *p* de 0.05.

» Resultados

Características de los pacientes: Se analizaron 22 pacientes, la media de edad fue de 40 años (rango 18-84), en cuanto al género, el 36% correspondieron al sexo femenino (n=8) y 64% al sexo masculino (n=14).

Resultados de la inducción: Acorde con la clasificación morfológica, la mayoría de los casos (n=14, 63%) presentaron leucemia aguda mielo-monoblastica (LAM-M4), seguido de leucemia aguda mieloide con diferenciación (n=7, 31%); por último, leucemia aguda mieloide sin diferenciación (LAM-M1), 4.5%. En cuanto a los resultados de inducción, se registró remisión completa en 45% de los casos.

» **Figura 1.** Análisis de la expresión del gen *MDR-1* en líneas hematópoyéticas leucémicas. **Panel Superior:** Expresión del gen *MDR-1* amplificando un fragmento de 420 pb en líneas celulares leucémicas, Carril 1 Jurkat, Carril 2 Molt 4, Carril 3 Reh, Carril 4 HL-60, Carril 5 U-937 y Carril 6 K-562; **Panel Inferior:** Expresión del gen constitutivo *GAPDH* amplificando un fragmento de 230 pb en líneas celulares leucémicas (Carril 1-6).

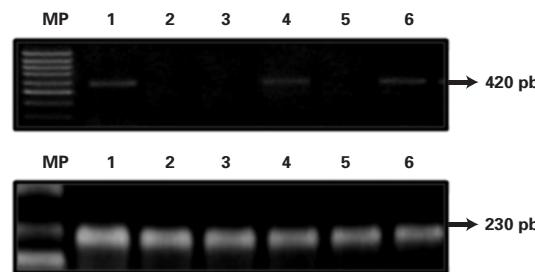


Expresión del gen *MDR-1* en líneas celulares leucémicas: Se analizó la expresión del gen *MDR-1* en seis líneas celulares leucémicas por medio de RT-PCR, (Jurkat, Molt-4, Reh, HL-60, U-937, K562). Se observó expresión en la línea celular K-562 amplificando un fragmento de 400pb, el resto de las líneas celulares leucémicas fueron negativas (**Figura 1**). Los productos amplificados de la línea celular K562 fueron secuenciados en el ABI Prism Dye Terminator Cycle. La secuencia obtenida fue alineada en el programa BLASTN del Gene-Bank, con resultado de 95% de homología con el gen *MDR-1* de la familia ABC-B1.

Expresión del gen *MDR-1* en pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica: Se analizó la expresión del gen *MDR-1* por RT-PCR en 22 pacientes con diagnóstico de LAM, vírgenes de tratamiento. La calidad del RNA fue evaluada por medio de la amplificación del gen de expresión constitutiva *GADPH* que amplifica un fragmento esperado de 230pb. Los resultados mostraron una frecuencia de expresión del gen *MDR-1* de 27.3% (6/22). Se utilizó como control positivo la línea celular K562 y control negativo la línea celular leucémica HL-60 (**Figura 2**).

Correlación de factores clínicos con la expresión del gen *MDR-1*: Se correlacionaron la expresión del gen *MDR-1* y los factores clínicos como: edad, sexo, número de leucocitos, hemoglobina, hematocrito, número de plaquetas, tipo de leucemia, y remisión clínica. De acuerdo con los resultados obtenidos, se evidenció correlación estadísticamente significativa ($p = 0.009$) entre la expresión del *MDR-1*, con la actividad del padecimiento de base posterior al

» **Figura 2.** Análisis de la expresión del gen *MDR-1* en los pacientes con LAM. **Panel Superior:** Carril 1 control positivo línea celular K562, Carril 2 control negativo línea celular HL-60, Carriles 3-6 muestras de los pacientes con LAM. **Panel Inferior:** Amplificación del gen constitutivo *GAPDH* de 230 pb.



» **Tabla 1.** Correlación clínica entre la expresión del gen *MDR-1* y parámetros clínicos en los pacientes con LAM.

	Positivo	Negativo	p
MDR-1	6 (27.3%)	16 (72.7%)	
Edad	41 ± 22	40 ± 16	NS
Leucocitos	81783 ± 121240	44031 ± 72548	NS
Plaquetas	44500 ± 44939	77938 ± 148256	NS
Hb	7 ± 1	7 ± 2	NS
Hto	21 ± 4	22 ± 6	NS
Sexo Femenino	3	5	
Masculino	3	11	
Dx M1	1	0	NS
M2	1	6	
M4	4	10	NS
Remisión			
SR	6	6	
RC	0	10	0.009*

SR = Sin remisión; RC = Remisión completa; * = valor estadísticamente significativo, $p < 0.05$; NS = no significativo.

tratamiento de Inducción (leucemia refractaria). No se observó correlación con ningún otro parámetro clínico (**Tabla 1**).

» Discusión

En la actualidad, las tasas de éxito en el tratamiento de las LAL, es de alrededor de 80% a 95% en población

pediátrica y entre 20% a 30% en la población adulta. En cuanto a la LAM, su pronóstico continua siendo desfavorable, tanto en población pediátrica (25%) y población adulta (15%).²⁶⁻²⁹ En la actualidad, la resistencia celular a la quimioterapia representa la principal causa de falla en el tratamiento de las neoplasias onco-hematológicas; esto se traduce en elevadas tasas de mortalidad. Uno de los mecanismos más estudiados en la resistencia a las diversos agentes quimioterápicos y quizás el más importante, es la presencia de la glucoproteína P (gp-P170), resultante de la expresión del gen *MDR-1* sobre las células leucémicas. La actividad de bomba dependiente de energía de la gp-P170 permite la eliminación rápida del fármaco localizado en el interior de la célula expulsándolo a través de una bomba de cationes hacia el espacio extracelular y por lo tanto la falla al tratamiento. Los resultados que informamos en este trabajo, están encaminados a evaluar la importancia del estudio del gen *MDR-1* en los pacientes con LAM en la población mexicana y su correlación clínica. Se analizó la expresión del gen *MDR-1* en diversas líneas celulares, detectando expresión únicamente en la línea celular K562. La frecuencia de la expresión del gen *MDR-1* en pacientes con LAM es de 39%³⁰⁻³² y en recaída alcanza 71%.³³⁻³⁵ En nuestros pacientes se obtuvo una frecuencia de expresión de 27.3%. Las diferencias obtenidas de expresión podrían deberse al número de muestras incluido en el estudio. En cuanto a la correlación con factores clínicos se encontró significancia estadística entre la expresión del gen *MDR-1* y la presencia de refractariedad al tratamiento inicial (inducción a la remisión), lo que condiciona leucemia refractaria, lo que coincide con lo informado por diversos autores en pacientes con recaída de su enfermedad.³⁰⁻³⁵ En cuanto al resto de las variables (edad, género, subtipo morfológico, cuenta inicial de blastos) no se evidenció correlación estadística.

En conclusión, la detección del gen *MDR-1* es de gran importancia como un marcador molecular que podría tener relevancia en la falla al tratamiento en LAM.

» Agradecimientos

Proyecto apoyado por CONACyT 80085, P48015-M y por la Dirección de Investigación del Hospital General de México: número de registro DIC/08/103/03/0007.

Referencias

- van den Heuvel-Eibrink MM, Wiermer EAC, de Boevere MJ, et al. MDR1 expression in poor risk acute myeloid leukemia with partial or complete monosomy 7. Leukemia 2001;15:398-405.
- Alexandrova R. Multidrug Resistance and P-Glycoprotein. Experimental Pathology and Parasitology 1998;1:62-66.
- Fernandez AJ, Crombet RO, Villares AI, et al. Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. Revista Cubana de Oncología 1998;14:111-120.
- Szakacs G, Gottesman MM. Comparing Solid Tumors with Cell Lines: Implications for Identifying Drug Resistance Genes in Cancer. Molecular interventions. 2004;4:323-325.
- Casale F, D'Angelo V, Adeeo R, et al. P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. Oncol Rep 2004;12:1201-1207.
- Karp JE. MDR modulation in acute myelogenous leukemia: is it dead. Leukemia 2001;15:666-667.
- Huesker M, Folmer Y, Schneider M, et al. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of Anti MDR1 ribozymes. Hepatology 2002;36:874-884.
- Tawa A, Inoue M, Ishihara S, et al. Increased expression of the multidrug-resistance gene in undifferentiated sarcoma. Cancer 1990;66:1980-1983.
- Kudo T, Nakagawa H, Takahashi M, et al. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. Molecular Cancer 2007;6:32-40.
- Wu L, Xu X, Shen J, et al. MDR1 gene polymorphisms and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. J Surg Oncol 2007;96:62-68.
- Yong-bing C, Mao-lin Y, Jian-ping G, et al. Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant monoclonal cell line HepG2/mdrl. Chin Med J 2007;120:703-707.
- Yamaguchi M, Kita K, Miwa H, et al. Frequent expression of P-Glycoprotein/MDR1 by nasal T-cell lymphoma cells. Cancer 1995;76: 2351-2356.
- Leonesa F, Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. Endocrine-Related Cancer 2003;10:43-73.
- Trock BJ, Leonesa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp 170 expression and its possible functional significance. J Natl Cancer Inst. 1997;89:917-931.
- Nelson Ej, Hinkle PM. Characterization of multidrug-resistant pituitary tumor cells. Endocrinology 1992;130:3246-3256.
- Trejo AR, Luque CD. Expresión y actividad de ATPasa transportadora de múltiples drogas (MDR1) en cáncer de células germinales. Memorias de XIV congreso de Bioenergetica y Biomembranas 2005:1-7.
- Illmer T, Schuler US, Thiede C, et al. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. Cancer Research 2002;62:4955-4962.
- Wells RJ, Odom LF, Gold SH, et al. Cytosine arabinoside and mitoxantrone treatment of relapsed or refractory childhood leukemia: initial response and relationship to multidrug resistance gene 1. Medical and Pediatric Oncology 1994;22:244-249.
- Hoelzer D, Thiel E, Löföller H, et al. Prognostic factors in multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. Blood 1988;71:123-131.
- Schrappé M, Arico M, Harbott J, et al. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. Blood 1998;92:2730-2741.
- Ambudkar AV, Sauna ZE, Gottesman MM, et al. A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1). Trends Pharmacol Sci 2005;26:385-387.
- Gruol DJ, Zee MC, Trotter J, et al. Reversal of Multidrug Resistance by RU 4861. Cancer Research 1994;54:3088-3091.
- Yusa K, Tsuruo T. Reversal mechanism of Multidrug resistance by Verapamil: direct binding of Verapamil to P-Glycoprotein on Specific Sites and transport of Verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. Cancer Research 1989;49:5002-5006.
- Volm M, Zintl F, Edler L, et al. Prognostic value of protein kinase C, Proto-Oncogene products and resistance-related proteins in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. Medical and Pediatric Oncology 1997;28:117-126.
- Abd El-Ghaffar HA, Aladle DA, Farahat SE, et al. P-glycoprotein (P-170) expression in acute leukemias. Hematology 2006;11:35-41.
- Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise Review: Clinical Relevance of Drug-Drug and Herb-Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). The Oncologist 2007;12:927-941.
- Arbelbide J, García Rivello H, Tacchi M.C, et al. Importancia pronóstica de la expresión de MDR-1 en la Leucemia Aguda Mieloblástica. Medicina (Buenos Aires) 2003;63:277-282.
- Leith CP, Kopecky KJ, et al. Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Assessment of Multidrug Resistance (MDR1) and Cytogenetics Distinguishes Biologic Subgroups With Remarkably Distinct Responses to Standard b Chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. Blood 1997;89:3323-3329.
- Sobrevilla, Sánchez Labardini, et al. Tratamiento actualizado de la Leucemia Mieloblástica Aguda del Adulto. Rev Hematología 2008;1:S1-S9.
- Zhou DC, Marie JP, Suberville AM, Zittoun R. Relevance of mdr-1 gene expression in acute myeloid leukemia an comparison of different diagnostic methods. Leukemia 1992;6:879-85.
- Miwa H, Kita K, Nishii K, et al. Expression of MDR1 gene in acute leukemia cells: association with CD7+ acute myeloblastic leukemia/acute lymphoblastic leukemia. Blood 1993;82:3445-51.

32. Pirker R, Wallner J, Geissler K, et al. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Nat Cancer Inst* 1991;83:708-12.
33. Miyachi H, Takemura Y, Yonekura S, et al. MDR1 (multidrug resistance) gene expression in adult acute leukemia: correlations with blast phenotype. *Int J Hematol* 1993;57:31-37.
34. Zhou DC, Hoang-Ngoc L, Delmer A, et al. Expression of resistance genes in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994;13:27-30.
35. Gruber A, Areström I, Albertoni F, et al. Multidrug resistance (*Mdr-1*) gene expression in peripheral blasts from patients with acute leukemia only rarely increases during disease progression after combination chemotherapy. *Leuk Lymphoma* 1995;18:435-442.