

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
PUEBLA

Pos

grados en Ciencias de la Salud

Maestría en Ciencias de la Salud

Título de la tesis

“Evaluación de la actividad de la Glicoproteína-P en pacientes
con LLA bajo tratamiento de quimioterapia”

Autor

Samuel Issac Hernández Sánchez

Para obtener el título de
Maestro en Ciencias de la Salud

Directoras de Tesis

Dra. Sandra Maldonado Castañeda

Asesor Experto y Metodológico

Dra. Elena Soto Vega

Sede del estudio

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Una Nueva Esperanza

Puebla

Octubre 2022

INTRODUCCIÓN



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Epidemiología cáncer pediátrico en el mundo y México

El cáncer es una enfermedad frecuente que se encuentra entre las primeras causas de muerte en el mundo, sin embargo, en los niños es relativamente rara. El cáncer pediátrico es un grupo heterogéneo de neoplasias que consiste en diferentes patologías manifestadas por medio de distintos patrones de ocurrencia, etiología, tratamiento, pronóstico y comorbilidades (1). Los avances en el diagnóstico, farmacología y tratamiento han impactado en el incremento en la supervivencia de niños con cáncer y disminuido la tasa de mortalidad (2).

No obstante, no todos los niños están beneficiados por estas estadísticas ya que el pronóstico depende del tipo de neoplasia, sitio anatómico afectado, etapa de la enfermedad, edad de inicio y lesiones celulares (5). Además, las tasas de supervivencia varían dependiendo de la región del mundo, debido a los recursos, ingresos económicos y nivel socioeconómico. La incidencia global del cáncer pediátrico es de 360,000 niños afectados (4). A nivel mundial, los tipos de cáncer más comunes en pacientes pediátricos son leucemia, tumores cerebrales y de médula espinal, neuroblastoma, tumor de Wilms, linfomas y tumores óseos (7).

En México, según el Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA), se estima que cada año se diagnostican alrededor de 5,000 casos nuevos de cáncer en personas menores de 18 años. El cáncer se encuentra entre las primeras causas de muerte en los niños de 1 a 14 años de edad. En el grupo de 10 a 14 años es la segunda causa de muerte, precedida solo por accidentes. Sin embargo, para el grupo de 5 a 9 años es la primera causa de defunción en el periodo 2012-2018 (6).

La leucemia es el tipo de cáncer más común en México y el mundo. El tipo de cáncer con el mayor número de casos es la leucemia linfoblástica aguda con 5,337 de casos, de los cuales 3,025 fueron hombres y 2,512 fueron mujeres. Seguido se encuentra la leucemia mieloblástica aguda con 980 casos, de los cuales 529 fueron hombres y 451 mujeres. En el 2017, 73% de los egresos hospitalarios por cáncer en población de 0 a 19 años de edad fueron por neoplasias en tejidos linfoides, hematopoyéticos o tejidos relacionados. Además,

la leucemia linfoblástica aguda representa el 61% del total de egresos por cáncer, 40, 679, en ese grupo de población. Al mismo tiempo, la leucemia es la principal causa de muerte por cáncer en la población con menos de 15 años, seguida por el tumor maligno de las meninges, encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central (1).

Leucemia

Leucemia es un tipo de cáncer derivado de cualquiera de las células hematopoyéticas de la médula ósea, más comúnmente las células leucocitarias. Existen dos tipos principales de leucemia en niños: leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una proliferación maligna de células linfoides en una etapa temprana de diferenciación que puede invadir la médula ósea, la sangre y los sitios extramedulares (9).

La LLA representa aproximadamente el 80% de todas las leucemias pediátricas. Es más común en niños de 2 a 5 años, pero ocurre en todos los grupos de edad. Se ha encontrado un mayor número de incidencia en poblaciones caucásicas e hispánicas (8). La LLA es más común en el sexo masculino y tienen un ligero peor pronóstico. El 85% de la LLA pediátrica se origina de los linfocitos B, mientras que el 15% se origina de los linfocitos T. Ambas formas tienen múltiples subtipos comúnmente definidos por alteraciones cromosómicas estructurales que producen lesiones, con alteraciones del número de copias de ADN somáticas secundarias, adquiridas por el tumor, y mutaciones de secuencia que contribuyen a la leucemogénesis.

LLA consta de varias entidades con distintos conjuntos de alteraciones genéticas somáticas. Estas alteraciones genéticas incluyen aneuploidía, reordenamientos cromosómicos que interrumpen la expresión génica o conducen a la expresión de proteínas de fusión quiméricas, deleciones y ganancias de ADN y mutaciones en las secuencias de ADN. En promedio, todos los genomas de infantes con LLA contienen 10 a 20 mutaciones codificantes no silenciosas en el momento del

diagnóstico y son aproximadamente el doble en el momento de la recaída. Muchas mutaciones perturban procesos celulares clave, incluida la regulación transcripcional del desarrollo, la diferenciación linfoide, regulación del ciclo celular, la vía supresora de tumores de la proteína del retinoblastoma TP53, receptor del factor de crecimiento, señalización Ras, fosfatidilinositol 3-quinasa y JAK-STAT, metabolismo de nucleótidos y modificación epigenética.

Las anomalías cromosómicas más comunes observadas en niños con LLA de células B son la hiperdiploidía (más de 50 cromosomas) y los subtipos ETV6 RUNX1 (t12; 21), ambos asociados con resultados favorables. Los pacientes adolescentes y adultos jóvenes con LLA tienen una incidencia mucho más baja de hiperdiploidía y ETV6-RUNX131 y una mayor incidencia de citogenética desfavorable, incluida LLA positiva para Filadelfia, hipodiploidía y cariotipo complejo. La anomalía citogenética más importante es el cromosoma Filadelfia. Se observa solo en el 3% de los pacientes pediátricos, pero aproximadamente en el 25% de los adultos, y aumenta con la edad, lo que representa aproximadamente la mitad de los casos en pacientes mayores de 60 años. Aunque el resultado de los pacientes con LLA con cromosoma Filadelfia positivo ha mejorado con la adición de un inhibidor de la tirosina quinasa (TKI).

Los síntomas de presentación más comunes de la leucemia son el resultado de la proliferación clonal de blastos leucémicos en la médula ósea, lo que impide la producción normal de glóbulos rojos, plaquetas y neutrófilos. Las características más comunes incluyen manifestaciones de anemia, trombocitopenia y neutropenia; incluyendo palidez y fatiga, petequias o púrpura e infecciones. La linfadenopatía, hepatomegalia y esplenomegalia están presentes en más del 60% de los pacientes. Puede ocasionar dolor y sensibilidad en los huesos y las articulaciones debido a la afectación leucémica del periostio de los huesos y las articulaciones. Los bebés y los niños pequeños pueden presentar cojera o negarse a caminar. (1)

El diagnóstico de LLA se basa en las directrices de clasificación de la OMS de 2016, que incorporan la caracterización de la morfología celular, inmunofenotipo,

genética y citogenética. La identificación morfológica de linfoblastos por microscopía puede evaluar los infiltrados de sangre periférica y médula ósea, mientras que la inmunofenotipificación es el estándar de oro para la evaluación del linaje celular, la clasificación y la detección de rasgos importantes para evaluar la enfermedad residual mínima (36).

Para el análisis cromosómico, la citogenética convencional debe realizarse en cada paciente y complementarse con hibridación in situ o RT-PCR para detectar anomalías genéticas seleccionadas. La citometría de flujo también es un método útil para determinar la aneuploidía. Los avances recientes en la secuenciación de próxima generación han hecho posible secuenciar genomas completos, y las técnicas de diagnóstico pueden reemplazarse una vez que este enfoque se convierta en principal y accesible (36).

Los componentes básicos de varias terapias para niños con LLA son similares e incluyen varias fases distintas. La terapia de inducción dura de 4 a 6 semanas e incluye un glucocorticoide (prednisona o dexametasona), vincristina, preparación de asparaginasa, uso opcional de una antraciclina y quimioterapia intratecal. Casi todos los pacientes logran la remisión, pero esto no es una cura, ya que la recaída ocurrirá universalmente sin tratamiento adicional. Después de la remisión, el tratamiento incluye de 6 a 8 meses de quimioterapia combinada intensiva diseñada para consolidar la remisión y prevenir el desarrollo de leucemia manifiesta del SNC. A continuación, se administra el tratamiento en una fase de intensificación retardada de 8 semanas (protocolo II), basado en el protocolo I de Berlín-Frankfurt-Münster de 8 semanas. Los ciclos repetidos de metotrexato, administrados ya sea como una infusión intravenosa corta o en dosis altas durante 24 horas, seguidos de la administración de ácido folínico para "salvar" el tejido normal de los efectos tóxicos, son una parte esencial de los regímenes de tratamiento actuales del LAL.

Quimioresistencia

Actualmente, la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía son las terapias contra el cáncer más comunes. Para cánceres como linfoma, leucemia, cáncer de pulmón microcítico, la quimioterapia es la primera línea de tratamiento. Para otros tumores sólidos, la quimioterapia se puede utilizar como tratamiento auxiliar para eliminar los nódulos residuales postoperatorios para prevenir la recaída o como terapia neoadyuvante antes de la cirugía o la radioterapia. A pesar de la llegada de nuevas intervenciones terapéuticas, como la inmunoterapia y la viroterapia, en el cáncer, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento más común y de primera línea. Aunque los fármacos quimioterapéuticos han logrado grandes avances, la aparición de resistencia a estos agentes conduce al fracaso del tratamiento, la recaída del cáncer y la metástasis. Para los pacientes con cáncer avanzado, la farmacorresistencia es un obstáculo importante para el éxito del tratamiento. Según informes estadísticos, más del 90% de las muertes de pacientes con tumores están asociadas con la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos (37).

La resistencia a la quimioterapia puede estar presente intrínsecamente antes de la administración de la quimioterapia debido a cambios genéticos y congénitos que afectan la sensibilidad a los fármacos sin exposición previa a agentes quimioterapéuticos. La resistencia también puede desarrollarse durante la quimioterapia para cánceres que inicialmente eran sensibles a los medicamentos pero que luego reaparecieron en una forma resistente a los medicamentos. De igual manera se ha estudiado que los cánceres suelen consistir en un grupo heterogéneo de células sensibles a los fármacos y resistentes a los fármacos. El impacto masivo de la resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos ha llevado a estudios extensos de aspectos mecanicistas y estrategias para comprender, modificar o evitar la quimiorresistencia (39)

Los mecanismos de resistencia a la quimioterapia en el cáncer son complejos y multifactoriales. Se ha demostrado una variedad de factores que están involucrados en la quimiorresistencia, incluidas las concentraciones intracelulares reducidas de los fármacos, las alteraciones en los objetivos de los fármacos, la

desregulación de las vías de señalización de la apoptosis y la supervivencia celular, y las interacciones entre las células cancerosas y el microambiente tumoral (27).

El mecanismo predominante de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) del cáncer es la expresión de una clase de bombas de eflujo dependientes de energía llamadas transportadores de casete de adenosina trifosfato (ATP) (ABC). De estos miembros, al menos tres son transportadores, incluida la glicoproteína P (P-gp, también llamada proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos, MDR1 o ABCB1), proteína 1 relacionada con MDR (MRP1 o ABCC1) y proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP o ABCG2), en relación con la multirresistencia. Esto conduce a una disminución de la acumulación de fármacos dentro de las células y, por tanto, a una disminución de la eficacia del fármaco (11).

Glicoproteína P

En la membrana plasmática de las células se forma un sistema semipermeable y selectivo que actúa como un filtro de moléculas de naturaleza endógena o exógena, permitiendo su ingreso o salida de acuerdo con las necesidades metabólicas de cada célula. Este sistema de transporte se encuentra, en gran medida, regulado por un conjunto de proteínas transmembranales que llevan a cabo un rol crítico en el movimiento de sustancias como carbohidratos, péptidos, aminoácidos y nucleósidos, así como xenobióticos.

Dentro de los principales tipos de transporte en la membrana celular se encuentra el transporte activo, el cual depende de forma directa de la hidrólisis de moléculas de ATP. Son 4 las proteínas transportadoras las que pertenecen a este grupo, también denominadas bombas ATPasas de las cuales, la superfamilia de transportadores ABC conforma el mayor grupo. (13)

La primera proteína de este grupo se identificó en 1976 como una glicoproteína de membrana que presentaba acción transportadora de fármacos afectando su absorción, así como su eliminación. Fue caracterizada como agente de resistencia múltiple a fármacos en células de ovarios de hámster chino, se trata de la

glicoproteína P/MDR/ABCB1 descrita por Ling y colaboradores. Esta superfamilia de proteínas ha ido creciendo hasta formar actualmente un conjunto de 49 genes identificados con una o dos regiones de unión ABC conformados por dos dominios o subunidades transmembranales que conforman la vía de translocación, y dos dominios o subunidades de unión a nucleótidos citoplasmáticos que se encargan de la hidrólisis del ATP. (14)

Los 49 transportadores ABC descritos se clasifican en 7 subfamilias o subgrupos, de la A la G según las características de la secuencia que los conforman y su homología; la subfamilia A conformada por 12 genes involucrados en el transporte de lípidos, la subfamilia B con una integración de 11 genes los cuales se han relacionado con la resistencia múltiple a fármacos en células cancerosas, la subfamilia C incluye 13 genes asociados a resistencia múltiple a fármacos entre los que se encuentra el gen de la fibrosis quística, la subfamilia D que agrupa cuatro genes que codifican semitransportadores peroxisomales, la subfamilia E posee una sola proteína característica con unión a aniones inorgánicos, la subfamilia F incorpora 3 miembros de proteínas de las cuales no se ha identificado su función transportadora al no poseer dominios transmembranales y la subfamilia G que incluye 5 genes capaces de codificar semitransportadores inversos. (15)

La Glicoproteína P (P-gp) también llamada MDR1, un transportador ABC (casete de unión de ATP) compuesto por 1.280 aminoácidos que constituyen un dominio transmembranal sobre la célula, su función concreta se lleva a cabo al ser una bomba de salida de fármacos dependiente de la energía codificada por el gen MDR1 humano.

El gen MDR 1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 y permite codificar una proteína de 170 kd (p 170), también conocida como glicoproteína P (por su permeabilidad). Dicho gen forma parte de una pequeña familia que tiene 2 miembros en los humanos (*mdr 1* *mdr 2/3*).

La glicoproteína P (P-gp) se identificó por primera vez como un transportador de eflujo relacionado con la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en células cancerosas, incluidos el adenocarcinoma y la leucemia. Posteriormente, se

encontró que este transportador se expresa no solo en las células tumorales sino también en tejidos normales como el intestino, hígado, riñón, cerebro y la glándula suprarrenal. La P-gp sirve para proteger estos órganos al mediar el transporte de salida de compuestos exógenos. Se considera que este transportador actúa como barrera para la absorción de fármacos en el intestino y también para la distribución de fármacos al cerebro y a las células tumorales. (16)

Además del papel de la P-gp en el cáncer, la P-gp juega un papel fundamental en la desintoxicación fisiológica normal y los procesos de protección del huésped mediante la transferencia de muchos sustratos exógenos y endógenos. Superficies de células epiteliales donde se expresa en niveles elevados, como en la membrana mucosa del tracto gastrointestinal, en el epitelio hepatobiliar, en los túbulos proximales de los riñones, en la corteza suprarrenal y en los septos de tejido sanguíneo. Este último incluye la placenta, el endometrio, el tejido testicular y el componente endotelial de la barrera hematoencefálica (Yano, 2018).

Se ha demostrado que la cantidad de expresión de P-gp en la glándula suprarrenal y los riñones está elevada o por encima de los niveles detectados en algunas líneas de células tumorales resistentes. La P-gp protege las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Además, la P-gp expresada en el epitelio intestinal tiene un impacto significativo en la biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía oral debido a su capacidad para alterar la absorción tisular y eliminar la conversión de fármacos en bilis y orina (Ferreira, 2015).

Las células cancerosas pueden desarrollar fenotipos específicos caracterizados por la sobreexpresión de P-gp que confiere resistencia a una amplia gama de sustancias estructuralmente independientes que pertenecen al grupo de sustratos de P-gp. Cuando se expresa en células neoplásicas, la P-gp puede causar resistencia masiva a fármacos contra sustratos que incluyen antraciclinas (Doxorrubicina), alcaloides de vinca (Vincristina) y actinomicinas (Actinomicina D, dactinomicina), taxoles (Paclitaxel), agentes alquilantes (mitomicina C), antibióticos peptídicos (gramicidina, valinomicina) y muchos otros fármacos.

También se ha demostrado que la presencia de polimorfismos del gen MDR1 en células eucariotas humanas puede alterar la expresión y función de la P-gp resultando en una modificación de la farmacocinética y farmacodinamia de las drogas (Callaghan, 2015).

Estructura y mecanismo de acción de la P-gp

La P-gp humana consta de 1280 aminoácidos y tiene dos mitades. La mitad N-terminal contiene 6 dominios transmembrana, seguidos de un gran dominio intracelular con un sitio de unión de ATP. La segunda mitad también contiene 6 dominios transmembrana y un sitio de unión de ATP. Un enlace flexible conecta las dos mitades. Hay tres sitios de unión de glicosilación en el primer dominio extracelular. Existe una heterogeneidad de secuencia del 65% entre las dos mitades. La P-gp utiliza la hidrólisis de ATP para transportar una amplia variedad de sustratos no unidos químicamente y estructuralmente, incluidos fármacos hidrófobos de origen natural, reactivos anti-cáncer no unidos estructuralmente. Los fármacos se transportan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembranal y cuya salida requiere de un cambio conformacional directa o indirectamente, luego de su unión a moléculas transportadoras que pueden ser péptidos o proteínas.

Los segmentos que conforman a la P-gp se encuentran divididos por largas cadenas de aminoácidos en la cara citoplasmática de la membrana celular y por cadenas de secuencia corta en la cara extracelular así como una cadena de carbohidratos en esta misma región que lleva a cabo la unión de los dos primeros segmentos transmembranales en el extremo N-terminal de la proteína, esta cadena de carbohidratos no interviene en el proceso de transporte de xenobióticos. (17)

Diversos estudios sugieren que la P-gp presenta diversos sitios de unión divididos en dos categorías de transporte y regulación. Estos dos sitios interactúan con diversos compuestos de manera alostérica como la indolizina sulfona, 1,4-

dihidropirimidas y vinblastina. La presencia de múltiples sitios de unión a fármacos en P-gp/MDR puede representar un modelo para la amplia gama de compuestos que se conoce interactúan con esta proteína. Estos sitios de unión pueden presentar cambios conformacionales que modifiquen su alta o baja afinidad afectando directamente su acción transportadora. Esto puede deberse a estímulos como la unión del sustrato o a la hidrólisis del ATP. En este modelo de mecanismo de la P-gp, los fármacos se unen de manera irreversible a una proteína y el complejo droga-proteína es eliminado de la célula por la P-gp. Esta proteína de unión primaria debe ser producida en cantidades suficientes ya que se exporta continuamente. La purificación de la P-gp desde diversos extractos membranales ha demostrado directamente su actividad ATPasa lo que permite determinar si la hidrólisis del ATP por la P-gp está relacionada con el eflujo o salida del fármaco. (18)

La actividad ATPasa de esta proteína es estimulada varias veces dependiendo los fármacos transportados. La mayoría de los sustratos que se transportan poseen una naturaleza hidrófoba y muchos están cargados positivamente junto con patrones característicos de aceptor de enlaces de hidrógeno. Debido a su hidrofobicidad, los fármacos se dividen en bicapas lipídicas o se unen estrechamente a proteínas y tienen bajas concentraciones libres en el citosol. En el "modelo de vacío hidrofóbico", la P-gp toma sus sustratos de la región interna de la membrana plasmática y los transporta a la fase acuosa extracelular. Por otra parte, el modelo de "flipasa" asume que los fármacos primero se dividen en la membrana lipídica y luego interactúan con la parte transmembrana de P-gp que "voltea" el fármaco del citoplasma al medio exterior. Desde el medio exterior, los fármacos se difunden a la fase acuosa extracelular o vuelven al medio citoplasmático, donde son recapturados. Este modelo de mecanismo de la P-gp propuesto por Higgins y Gottesman en 1992 es uno de los más utilizados. (19)

Modulación de la glicoproteína P

Los moduladores de P-gp son compuestos que, dependiendo de la concentración aplicada, mejoran o reducen la actividad de Pgp ATPasa.

La resistencia múltiple a drogas se ha visto influida por acción de la proteína quinasa C (PKC) que lleva a cabo un proceso de fosforilación importante in vivo e in vitro ya que modifican el fenotipo MDR y con ello la presencia de células resistentes se ve acompañada de alteraciones en la actividad enzimática de varias quinasas. La glicoproteína P es fosforilada en la porción basal por la PKC, lo que afecta al transporte de fármacos. Esta fosforilación se incrementa dos veces mediante el tratamiento con ésteres de forbol, en algunas líneas celulares de carcinoma. La fosforilación de la glicoproteína P aumenta la actividad extrusora y conduce a la eliminación de la droga de la membrana.

Se ha demostrado también que la glicoproteína P/MDR1 y el CYP3A tienen actividad sinérgica al presentar una barrera protectora en la biodisponibilidad de fármacos. Ambas se encuentran localizadas en las células epiteliales del intestino con lo cual reducen la biodisponibilidad de diversos fármacos ya sea por efecto del primer paso intestinal ejercido por CYP3A o por la salida de los mismos a la luz intestinal por acción de la glicoproteína P. La glicoproteína P se encarga de la eliminación de compuestos hacia la luz intestinal, y el CYP3A se encarga del metabolismo de la droga a través de reacciones en fase I. Además de llevar a cabo una acción conjunta dentro del metabolismo del fármaco, este sistema puede también interactuar en su propia regulación. (20)

Los inhibidores de Pgp son compuestos que ralentizan la tasa de actividad y transporte de P-gp ATPasa. Por lo tanto, estos moduladores aplicados a altas concentraciones, actúan como inhibidores (por ejemplo, verapamilo). Si se aplica junto con otros compuestos que interactúan con P-gp, concentraciones mucho más bajas pueden conducir a la inhibición. Como P-gp puede acomodar dos o más de dos moléculas no idénticas por ciclo de transporte, la inhibición de P-gp a menudo ocurre involuntariamente, si se aplica más de un fármaco, un fenómeno denominado interacciones fármaco-fármaco.

Un sustrato se define como un compuesto que muestra un flujo de salida activo más alto por P-gp que un flujo de entrada pasivo en un ensayo de transporte, también denominado flujo de salida neto, por ejemplo la vinblastina.

Los inductores de P-gp son particularmente abundantes en los fármacos citotóxicos contra el cáncer. Si los inductores son pequeños, actúan como moduladores. Si son grandes, son "sustratos", y si tienen muchos patrones, inhiben la actividad y el transporte de Pgp ATPasa en concentraciones bajas y actúan como inhibidores. (19)

La sobreexpresión de la glicoproteína P (P-gp) puede disminuir la concentración de fármacos intracelulares, como vinblastina, vincristina y daunomicina. La P-gp puede sobre expresarse en células neoplásicas. Puede deteriorar la respuesta terapéutica y el pronóstico en la terapia del cáncer, como sucede en leucemias agudas. Por lo tanto, la P-gp juega un papel importante en eficacia y toxicidad del fármaco.

Se ha encontrado expresión de P-gp a altos niveles en tejidos normales de hígado, páncreas, riñón (túbulos renales), colon, yeyuno y cortex adrenal. Esto sugiere que podría tener un papel fisiológico en procesos de secreción. En tejidos tumorales se ha visto que la correlación entre el incremento de expresión de P-gp y la resistencia a múltiples drogas debe ser la causa del fenotipo MDR. (21)

ANTECEDENTES

En diversos estudios se ha logrado demostrar la actividad de la Glicoproteína P y su asociación con la resistencia a fármacos en pacientes con cáncer.

Se ha demostrado en un ensayo realizado en Túnez a 59 pacientes con Leucemia mieloide que los pacientes con expresión positiva de P-gp tienen una baja probabilidad de lograr una mayor respuesta molecular al fármaco y un mayor riesgo de desarrollar una resistencia al Imatinib (IM) como tratamiento. Los resultados aquí sugirieron que la monitorización del nivel de expresión de P-gp

puede potencialmente identificar a los pacientes que probablemente desarrollen falta de respuesta a la IM o que no respondan a la terapia de IM. (22)

El-Ghaffar y colaboradores estudiaron la expresión de P-gp concluyendo que esta proteína se expresa en células leucémicas de pacientes en remisión en un mayor grado que aquellos con casos de novo en LLA y LMA. Estos resultados indican un grado predictivo de quimioresistencia que puede ser muy útil para la modificación de protocolos de quimioterapia, así como moduladores. Sin embargo, otros estudios no consideran como valor clínico los valores de expresión de P-gp. (23)

El grado de citotoxicidad celular por farmacorresistencia puede ser un determinante importante en el desenlace del régimen terapéutico. Existen diversos métodos para determinar el grado de farmacorresistencia celular in vitro, estos han sido descritos con ventajas y desventajas. N. Fazlina y colaboradores demostraron que los análisis de farmacorresistencia in vitro son una técnica importante y de gran ayuda al entendimiento de los mecanismos de resistencia celular a fármacos, especialmente en el caso de pacientes con leucemias agudas. (24)

Estudios llevados a cabo por Styezynki et al, indican que los pacientes con LLA en remisión presentan farmacorresistencia in vitro. Del mismo modo, la sobreexpresión de P-gp en sus pacientes fue frecuente con un posible pronóstico adverso. Los datos reportados ofrecen nuevas perspectivas respecto al rol de la farmacorresistencia de pacientes bajo remisión por LLA. (25)

Los modelos de cultivo celular utilizados para el estudio de la expresión del gen MDR se han realizado a partir de tejidos de diferentes especies a través del aislamiento de células sensibles al fármaco cuya concentración se aumenta gradualmente. Consecuentemente la P-gp se asocia como principal causa de resistencia a alcaloides de vinca, podofilotoxina, camptotecina, inhibidores de la tirosin kinasa, taxanos y epitolonas. (26)

Además, varios estudios asocian la sobreexpresión de P-gp como un factor adverso en el pronóstico de tumores sólidos y hematológicos (25). Además, la sobreexpresión de P-gp se ha encontrado en otras enfermedades inmunes como

la artritis reumatoide, donde se analizó la actividad funcional de la P-gp con un citómetro de flujo, lo que sugiere que los linfocitos periféricos de los pacientes artríticos tenían una mayor actividad de MDR (27).

En algunos estudios, una mayor expresión de P-gp se ha descrito en una recaída más que en el diagnóstico inicial de leucemia en adultos y se relacionó con un mayor riesgo de recaída (28). La sobreexpresión, el aumento de la función de la proteína P-gp y los niveles de ARNm han mostrado factores pronósticos negativos significativos para el resultado clínico en la LLA infantil. Sin embargo, otros estudios refutan el valor clínico de la expresión de P-gp (29).

Los estudios in vitro de blastos de leucemia mieloide aguda primaria (LMA) mostraron que la expresión de MDR1 P-gp puede estar relacionada con la resistencia a la apoptosis. También se descubrió que la P-gp juega un papel importante en la leucemia promielocítica aguda (APL) recidivante. Utilizando la citometría de flujo inmunitario y la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), Cianfriglia encontró que más de un tercio de las muestras de sangre leucémicas son P-gp positivas, que se asociaron con una menor respuesta de la quimioterapia y una mala supervivencia en pacientes con AML (30). En los linfocitos T humanos, la línea celular de glucocorticoides como prednisona y prednisolona, induce la actividad ABCB1 (31).

JUSTIFICACIÓN

La farmacorresistencia múltiple es uno de los factores mas importantes y determinantes ante la respuesta de una quimioterapia.

El eflujo de fármacos mediado por la glicoproteína P afecta drásticamente los niveles de concentración terapéutica en plasma. La resistencia multiple a fármacos mediada por la glicoproteína p presente en las membranas de las células es indicativo de un mal pronostico para pacientes que cursan un tratamiento contra la leucemia. Diversas investigaciones apoyan el valor clínico de su seguimiento y cuantificación al largo de un tratamiento.

La comprensión del impacto que tiene la sobreexpresión de la P-gp y su relación con la quimioresistencia y la afección del tratamiento abre un panorama importante a la identificación y correlación de variables pronósticas adicionales de valor clínico útil que propicien la aplicación de terapias adaptadas más precisas así como el desarrollo de fármacos que no generen farmacorresistencia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En pacientes con Leucemia linfoblástica aguda se ha registrado el desarrollo de resistencia múltiple a fármacos. La expresión de la P-gp aumenta en células leucémicas. Esta proteína ejerce una acción importante como factor responsable de una disminución en los niveles de fármaco en el interior de las células tumorales mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP.

Un problema importante en el tratamiento de la leucemia es el desarrollo de resistencia a los agentes quimioterapéuticos. Uno de los principales mecanismos de resistencia es un rápido flujo de medicamentos mediado entre otros por P-gp. El seguimiento de las concentraciones de la expresión de la Glicoproteína P puede aportar un valor clínico útil para el desenlace un tratamiento de quimioterapia.

HIPOTESIS

La sobreexpresión de la glicoproteína P es un factor de quimioresistencia en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda que afecta el éxito del tratamiento y con ello del pronóstico de vida.

OBJETIVOS

Determinar las concentraciones de Glicoproteína P durante el tratamiento de quimioterapia de inducción a remisión mediante ensayo de citometría de flujo en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda.

Particulares:

- Determinar la concentración de P-gp en al menos 4 valoraciones luego de que el paciente haya recibido tratamiento durante 4 meses.
- Evaluar los cambios que hayan ocurrido en las concentraciones glicoproteína P a lo largo del tratamiento.

METODOLOGÍA

- Tipo de diseño: Estudio descriptivo, observacional, longitudinal, prospectivo, unicéntrico y homodémico.
- Definición del universo de trabajo: Pacientes con LLA que sometidos a quimioterapia en la unidad de quimioterapia de Una Nueva Esperanza ABP.
 - o Criterios de inclusión:
 - Pacientes que se encuentran en fase de inducción a remisión
 - Régimen de tratamiento PETHEMA
 - Pacientes que acepten firmar el consentimiento informado.
 - o Criterios de exclusión:
 - Pacientes que no continúen el tratamiento.
 - Pacientes que en algún momento del estudio decidan no compartir su información.

Se utilizaron un total de 80 muestras obtenidas de 17 pacientes que se sometieron a quimioterapia en la unidad de quimioterapia de Una Nueva Esperanza A.B.P. Todos los pacientes contaba con el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de

células B, y se encontraban en el tratamiento en la fase de inducción a remisión, siguiendo el régimen de tratamiento PETHEMA, creado por el grupo PETHEMA en España utilizado inicialmente para tratar LLA en 1972. Este régimen está conformado por una o dos fases de inducción si es necesario, una fase de consolidación (la que incluye tres ciclos de quimioterapia), y una fase de mantenimiento. El regimen PETHEMA ha sido adaptado para niños, adolescentes y adultos, teniendo muy buen resultado en niños, con tasas de supervivencia de hasta el 95% en países desarrollados.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica las cuales fueron recolectadas en tubos EDTA de 5 ml cada vez que los pacientes se sometían a quimioterapia, con una duración de 4 meses. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de la extracción. Las células mononucleares eran separadas por centrifugación de gradiente de densidad estándar (Ficoll-Hypaque; Lymphoprep; Nycomed, Pharma, Oslo Norway). Después de lavarlas dos veces, las células viables se contaban con azul de tripano y ajustadas a 1×10^6 en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Un total de 2×10^6 células fueron incubadas con 40 μ L de 400 μ M daunorubicina, y una tinción extracelular fue realizada utilizando un anticuerpo humano: anti-CD45 APC (Beckman Coulter). Las células se dividieron en 2 alícuotas. Una alícuota se mantuvo a 4°C durante 30 minutos para permitir la medición de la captura basal de daunorubicina. La otra alícuota se incubó en un baño de agua a 37°C por 30 minutos, para que se pudiera llevar a cabo el eflujo (expulsión).

Después, las células fueron lavadas dos veces en un medio salino tamponado con fosfato, e inmediatamente se realizó un análisis con citometría de flujo (Gallios 8 Colors / 2 Lasers, Beckman Coulter). Todos los análisis fueron realizados utilizando un citómetro de flujo FACSscan con el software CellQuest (Kaluza flow analysis for Gallios 1.0). Se utilizaron ventanas electrónicas para permitir el análisis separado de todas las células sobre las características de dispersión lateral y dispersión frontal (para evitar diferencias en el tamaño o granularidad entre las poblaciones celulares, se establecieron gates estrechas en el medio de los cluster

celulares). Después de la primera selección, se filtraron solo las células que daban positivo al anti-CD45, y todos los análisis se llevaron a cabo con esas ventanas. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células capaces de expulsar la daunorubicina.

La intensidad de fluorescencia se registró en cada sujeto y en cada subpoblación celular para determinar las células con eflujo y las que no.

El estudio fue aprobado por el comité de bioética de la institución, al tratarse de sujetos menores de edad, los consentimientos informados fueron firmados por los tutores legales de los pacientes.

RESULTADOS

Se llevó a cabo el seguimiento de los pacientes en hasta 5 aplicaciones de quimioterapia. Los pacientes presentaban similitud en las condiciones de la enfermedad y se encontraban bajo el mismo esquema de tratamiento PETHEMA, la comparación de los resultados obtenidos para los 17 pacientes se representan en el gráfico 1.

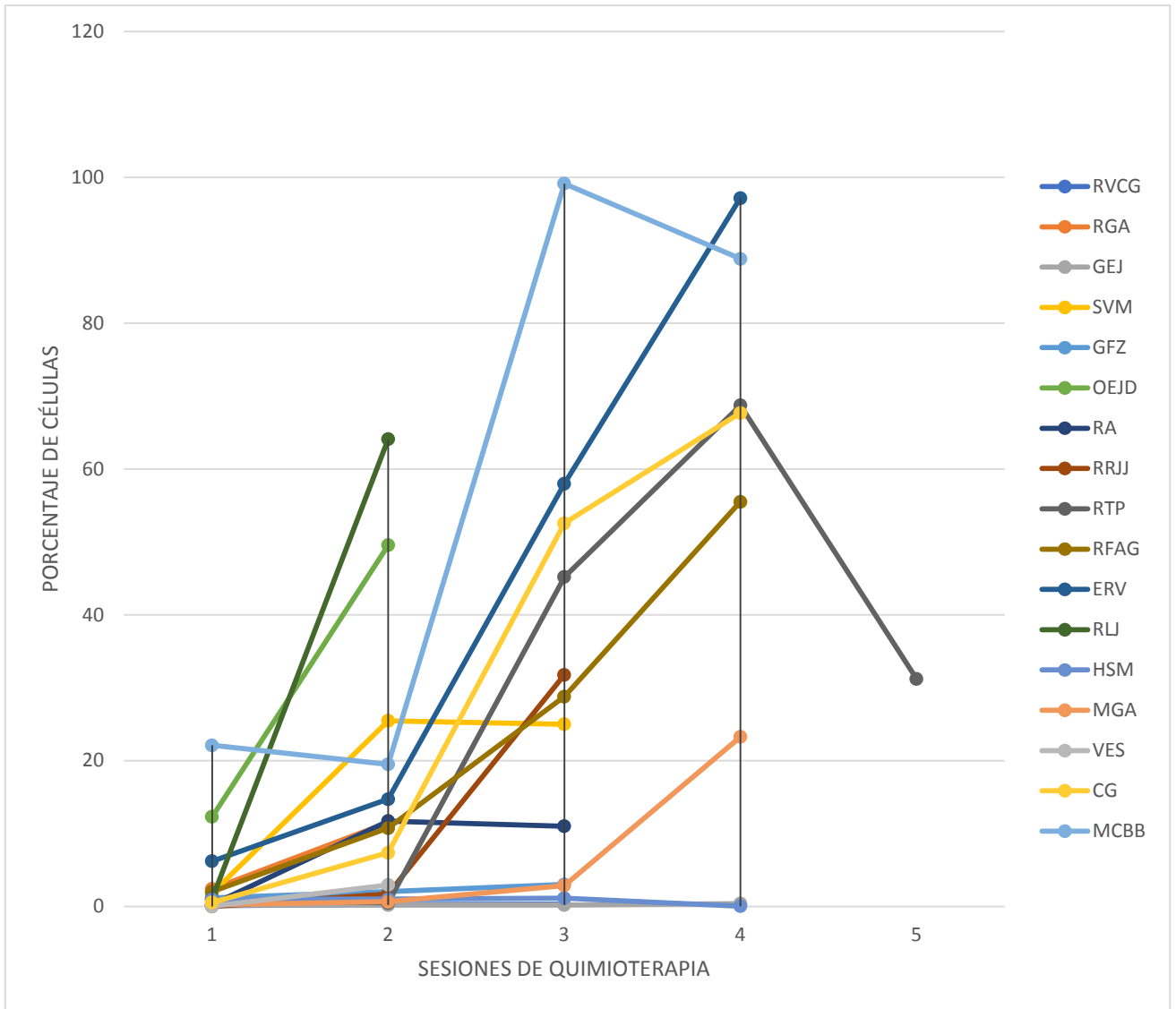


Gráfico 1.

La grafica muestra el resultado de la actividad de la Glicoproteína-P en todos los pacientes. Esta actividad fue determinada por medio de porcentaje de células capaces de extruír daunorribicina en linfocitos de sangre periférica en cada pacientes. Cada punto de la gráfica representa el promedio del porcentaje de todos los pacientes evaluados en cada ciclo de quimioterapia.

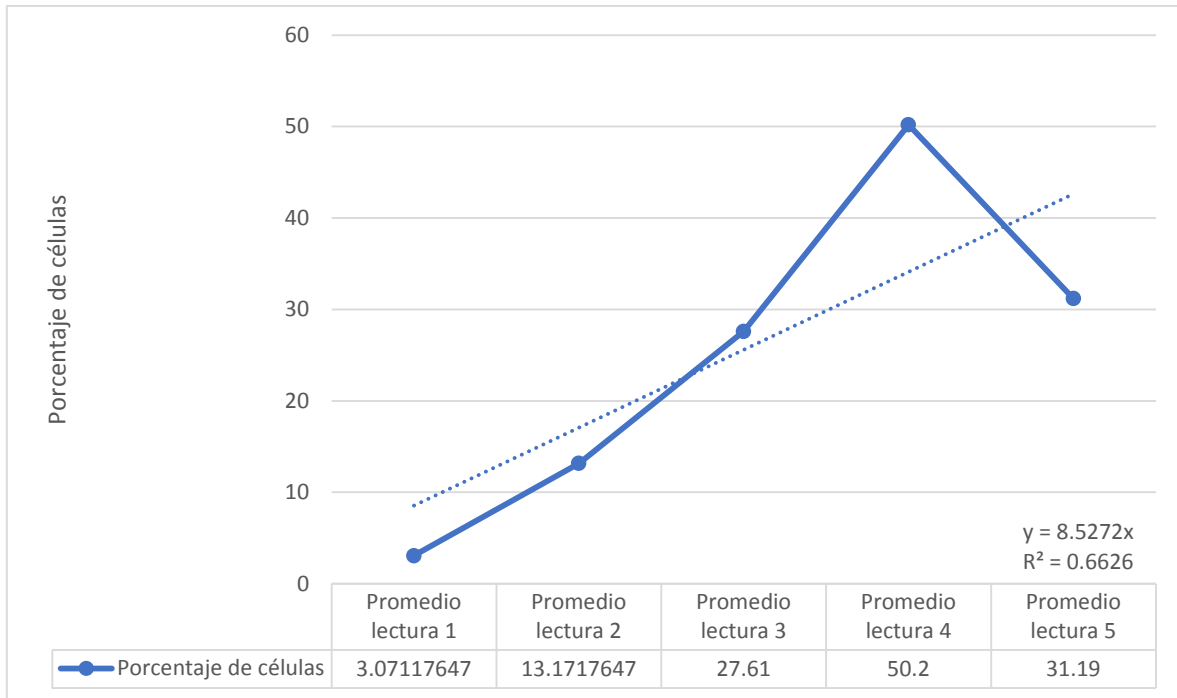


Grafico 2

El grafico 2 muestra el promedio de las lecturas del porcentaje de células capaces de extruir daunorrubicina para todos los pacientes dentro de las 5 tomas de muestra a lo largo del tratamiento. La línea punteada representa la línea de tendencia ajustada a estos porcentajes para cada una de las 5 lecturas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La manifestación de multirresistencia a fármacos es actualmente un fenómeno en estudio y de carácter multifactorial. Se conoce que la actividad de la Glicoproteína-P no es la única responsable de esta condición, sin embargo resulta un factor importante para aquellos pacientes cuyo tratamiento no está resultando efectivo.

Actualmente no existe un parámetro definido que explique de manera puntual el fenómeno por el cual la actividad de la Glicoproteína P puede verse modificada, sin embargo algunos autores indican una especial relación con diagnósticos desfavorables cuando esta actividad aumenta, mientras que otros autores no han determinado una correlación clínica directa de la glicoproteína P con el desarrollo del paciente.

Estudios llevados a cabo por Ivy y colaboradores demostraron que la Glicoproteína P no representa un marcador del pronóstico de leucemias infantiles luego de analizar su expresión antes y después del tratamiento para remisión. A pesar de ello se identificaron correlaciones en una tendencia de mejora al tratamiento luego de haber administrado moduladores de resistencia a fármacos. Esto sí demostró el papel de la multidrogoresistencia a fármacos como un factor importante en el pronóstico de la enfermedad a lo largo de un proceso terapéutico.

La Leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad de etiología heterogénea con una base genética asociada a múltiples genotipos que representan una respuesta distinta a los variados esquemas de tratamiento que existen para cada paciente de acuerdo a la manifestación de la enfermedad. Los resultados ante diversos estudios que demuestran una asociación entre la Glicoproteína-P y un pobre pronóstico son controversiales. Basados en estos informes, es importante esclarecer el mecanismo por el cual en primera instancia se desarrolla desde su origen la resistencia múltiple a fármacos, y además, las causas que permiten la expresión mayor en unos pacientes y en otros no. Por ello resulta importante el tomar en cuenta la historia clínica de cada paciente de manera individual y la específica relación de la actividad de la Glicoproteína P manifestada en cada uno de forma personalizada.

En este estudio se logró observar que la tendencia de la expresión de la Glicoproteína P para este grupo de pacientes fue en incremento, resultado observado de manera individual como en promedio para cada lectura. Se determinó la actividad de la Glicoproteína P en leucocitos de sangre periférica mientras que otros estudios como los llevados a cabo por Drach y colaboradores, utilizaron muestras de sangre periférica así como de médula ósea, reportando resultados para ambos tipos de células estudiadas. A pesar de ello se ha determinado que una de las formas más efectivas de medición de la Glicoproteína P es mediante un análisis de expresión genética. En el presente estudio, siguiendo otra metodología, se determinó la actividad de la Glicoproteína ya que su sobreexpresión se presenta como mecanismo de protección en las células resultando así

en una forma directa de evaluar la actividad de la Glicoproteína celular del paciente mientras éste se encuentra en tratamiento.

Actualmente, no se ha definido completamente el desarrollo de la sobreexpresión de la Glicoproteína P en pacientes con alguna forma de cáncer y son diversos los mecanismos que pueden estar involucrados, como factores de transcripción y vías de señalización.

Para este estudio no se realizó una evaluación periódica de la condición clínica de cada paciente, sin embargo la observación realizada sobre la expresión de la glicoproteína P resulta un factor importante para tomar en cuenta en aquellos cuyo pronóstico pudiera no ser favorable luego del tratamiento.

En este estudio se determina que la resistencia a fármacos debe ser evaluada cuando un paciente sufre una recaída, esto puede dar una vía alterna para dar continuidad a su tratamiento buscando mejores opciones acorde a la manifestación de la resistencia.

Como se observó en los resultados y comparando con otros estudios, la determinación de la expresión y actividad de la Glicoproteína P puede fungir como un biomarcador potencial de resistencia a fármacos que bajo evaluación, pudiera asociarse a al desarrollo de la enfermedad del paciente, como lo demostró Soto y colaboradores; la sobreexpresión e incremento de la Glicoproteína estaría relacionada con un peor pronóstico al tratamiento.

REFERENCIAS

1. INEGI. (2021). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) [Internet]. Inegi.org.mx. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf [citado 27 Agosto 2021]
2. Centro Nacional para la Salud de la Infancia y Adolescencia. (2019). Cáncer Infantil en México [Internet]. gob.mx. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud%7Ccensia/articulos/cancer-infantil-en-mexico-130956> [citado 27 Agosto 2021].
3. NIH. (2021). Childhood Cancers [Internet]. National Cancer Institute. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/childhood-cancers> [citado 27 Agosto 2021].
4. Ward Z, Yeh J, Bhakta N, Frazier A, Atun R. (2019). Estimating the total incidence of global childhood cancer: a simulation-based analysis. *The Lancet Oncology*, pp.20(4):483-493. [Internet]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/playContent/1-s2.0-S1470204518309094?returnurl=https:%20%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1470204518309094%3Fshowall%3Dt%20rue&referrer> [citado 26 Agosto 2021].
5. Johnston W, Erdmann F, Newton R, Steliarova-Foucher E, Schüz J, Roman E. (2021). Childhood cancer: Estimating regional and global incidence. *Cancer Epidemiology* [Internet]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877782119301729?via%3Dihub> [citado 26 Agosto 2021].
6. Erdmann F, Frederiksen L, Bonaventure A, Mader L, Hasle H, Robison L et al. Childhood cancer: Survival, treatment modalities, late effects and improvements over time. *Cancer Epidemiology* [Internet]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877782120300679?via%3Dihub> [citado 27 Agosto 2021].

7. Ganguly S, Kinsey S, Bakhshi S. (2021). Childhood cancer in India. *Cancer Epidemiology* [Internet]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877782120300138?via%3Dihub> [citado 27 Agosto 2021].
8. Globocan. (2020). Leukaemia [Internet]. Gco.iarc.fr. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/36-Leukaemia-fact-sheet.pdf> [citado 27 Agosto 2021].
9. Iacobucci I, Mullighan C. (2017). Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*; pp.35(9):975-983.
10. Onciu M. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*; pp.23(4):655-674.
11. Waghray D, Zhang Q. (2017). Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*; pp.61(12):5108-5121.
12. . Kattner P, Strobel H, Khoshnevis N. (2019). Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09836-y>
13. Li Q, Shu Y. (2014). Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Molecular and Cellular Therapies*. doi:10.1186/2052-8426-2-15
14. Kourti M, Vavatsi N, Gombakis N, Sidi V, Tzimagiorgis G, Papageorgiou T, Kolioukas D, Athanassiadou F. (2007). Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*; pp.166-73. doi: 10.1532/IJH97.E0624. PMID: 17875533.

15. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 3; pp. 281. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>

16. Olarte I, Miranda E. I, López A. (2010). Expresión del gen de resistencia a multidroga (MDR-1) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica. *Revista Médica del Hospital General de México*; pp. 219-224.

17. Kim, Y., & Chen, J. (2018). Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science*; pp. 915–919. doi:10.1126/science.aar7389

18. Ambudkar S. V., Kim I.-W., Sauna Z. E. (2006). The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; pp. 392–400. doi:10.1016/j.ejps.2005.10.010

19. Seelig A. (2020). P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Frontiers in Oncology*.

20. Zhou S.-F. (2008). Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*; pp. 38(7-8), 802–832. doi:10.1080/00498250701867889

21. Ruiz M. J., Souviron A., Martínez M. (2002). La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con

cáncer. *Anales de Medicina Interna*; pp. 19(9), 49-57. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992002000900011&lng=es&tlng=es [citado 27 Agosto 2021].

22. Ammar M, Louati N, Frikha I, Medhaffar M, Ghazzi H, Elloumi M, Mahmoud L. (2020). Overexpression of P-glycoprotein and resistance to Imatinib in chronic myeloid leukemia patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. doi:10.1002/jcla.23374

23. Abd El-Ghaffar HA, Aladle DA, Farahat SE, Abd El-Hady N. (2006). P-Glycoprotein (P-170) expression in acute leukemias. *Hematology*; pp.11(1):35–41.

24. Fazlina N, Maha A, Jamal R, Zarina AL, Cheong SK, Hamidah H, et al. (2007). Expression of multidrug resistance (MDR) proteins and in vitro drug resistance in acute leukemias. *Hematology*; pp. 12(1):33–7.

25. Styczynski J, Wysocki M, Debski R, Czyzewski K, Kolodziej B, Rafinska B, et al. (2007). Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*; pp.133(11):875–93.

26. Germann UA, Chambers TC. (1998). Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein. *Mult Drug Resist Cancer* 2; pp.31–60.

27. Borowski LC, Lopes RP, Gonzalez TP, et al. (2007). Is steroid resistance related to multidrug resistance-I (MDR-I) in rheumatoid arthritis?. *Int immunopharmacology*; pp.7(6):836-844.

28. Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, et al. (1998). Relationship between major vault protein/ lung resistance protein, multidrug resistant-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood*; pp. 91(6): 2092-2098.
29. Stam RW, van den Heuvel-Eibrink MM, den Boer ML, et al. (2004). Multidrug resistance genes in infant acute lymphoblastic leukemia: Ara-C is not a substrate for the breast cancer resistance protein. *Leukemia*; pp.18(1):78-83.
30. Cianfriglia M. (2013).The biology of MDR1-P-glycoprotein (MDR1-Pgp) in designing functional antibody drug conjugates (ADCs): the experience of gemtuzumab ozogamicin. *Ann Ist Super Sanità*; pp. 49:150-268.
31. Manceau S, Giraud C, Decleves X, et al. (2012). Expression and induction by dexamethasone of ABC transporters and nuclear receptors in a human T lymphocyte cell line. *J Chemother*; pp. 24(1):48-55.
- 32.Yano K, Tomono T, Ogihara T. (2018). Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; pp. 41(1):11-19.
- 33.Ferreira R, Dos Santos D, Ferreira M. (2015). P-glycoprotein and membrane roles in multidrug resistance. *Future Medicinal Chemistry*; pp. 7(7):929-946.
34. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. (2014). Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy?. *Drug Metabolism and Disposition*; pp.42(4):623-631.
- 35.DeAngelo D, Jabbour E, Advani A. (2020). Recent Advances in Managing Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*; pp. (40):330-342.
- 36.Malard F, Mohty M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*; pp.395(10230):1146-1162.

37. Zheng H. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*; pp. 8(35):59950-59964.

38. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*; pp.21(9):3233.

39. Abdullah LN, Chow EK. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med*. 2013 Jan 17;2(1):3. doi: 10.1186/2001-1326-2-3. PMID: 23369605; PMCID: PMC3565873.