

IMPORTANCIA PRONOSTICA DE LA EXPRESION DE MDR-1 EN LA LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

JORGE ARBELBIDE¹, HERNAN GARCIA RIVELLO², MARIA CECILIA TACCHI¹, DOROTEA FANTL¹, MARIA PAULA CARDENAS¹, Diana PENCHASKY¹, SUSANA VIÑUALES¹, ANA MORANDI², ELSA M NUCIFORA¹

¹Servicio de Hematología, ²Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Italiano de Buenos Aires

Resumen Una proporción importante de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA) presentan recaída o resistencia con el tratamiento. Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a drogas, es la presencia de la glicoproteína P 170 (gp-P 170) resultante de la expresión del gen MDR-1 sobre las células leucémicas. El objetivo de este trabajo es valorar el impacto pronóstico de la expresión de MDR-1 en una población de pacientes tratados por LMA. Se evaluó retrospectivamente la expresión de MDR-1 en una cohorte de 55 pacientes con LMA, mayores de 16 años, que recibieron tratamiento quimioterápico desde 1990 hasta el 2000. Se evaluó sobre biopsia de médula ósea, la expresión de MDR-1/gp-P 170 por inmunohistoquímica. Mediante una curva ROC, se estableció que una expresión de MDR-1 > 50% en células blásticas, resultó significativa para el logro de remisión completa. Esta expresión de MDR-1+ correlacionó con la presencia de leucocitosis: (p:0.002), expresión de células CD34+ (p:0.006), menor tasa de remisión completa (p:0.001), mayor tasa de recaída (p:0.02) y de estudios citogenéticos no favorables (p:0.02). La SLE fue de 21.2% ES:9.3 con un seguimiento de 22 meses para el grupo MDR-1+ versus 56.4% ES:12.5 con un seguimiento de 78 meses en los casos MDR-1- (p:0.007). Se puede concluir que la expresión de MDR-1 ha demostrado ser un factor pronóstico de resistencia a la quimioterapia. Estos pacientes presentan una menor tasa de remisión completa, una mayor tasa de recaída por persistencia de enfermedad residual post-tratamiento, lo que produce una menor sobrevida global.

Palabras clave: MDR-1, multiresistencia a drogas, leucemia mieloblástica aguda

Abstract *Prognostic value of the expression of MDR-1 in acute myeloid leukemia.* An important number of patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) experience relapse or resistance to chemotherapy. One of the mechanisms involved in this resistance is the presence of glycoprotein P170 (gp-P 170), which results of the MDR-1 gene in leukemic cells. The objective of this article is to assess the prognostic impact of the expression of MDR-1 in a group of patients treated for AML. The expression of MDR-1 was retrospectively assessed in a cohort of 55 patients with AML, older than 16 years old, who received chemotherapy from 1990 to 2000. The presence of MDR-1/gp-P170 was evaluated on bone marrow biopsy by immunohistochemistry. A ROC curve established that an expression of > 50% of MDR-1 on blastic cells was significant for the achievement of complete remission. The expression of MDR-1+ correlated with the presence of leucocytosis (p:0.002), expression of CD34+ cells (p:0.006), less achievement of complete remission (p:0.001), more rate of relapse (p:0.02) and of non-favorable cytogenetics (p:0.02). The event-free survival was of 21.2% SE:9.3 with a follow up of 22 months for the group of MDR-1+ versus 56.4% SE 12.5 with a follow-up of 78 months for the MDR-1- group (p:0.007). It can be concluded that the expression of MDR-1 is a prognostic factor of resistance to chemotherapy. These patients present a lower rate of complete remission, a higher rate of relapse with persistence of post treatment residual disease, which produces a shorter global survival.

Key words: MDR-1, multidrug resistance, acute myeloid leukemia, AML

Si bien durante las últimas décadas, con el tratamiento quimioterápico se ha obtenido una mayor tasa de remisión completa^{1, 4} y sobrevida libre de eventos en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA)^{5, 11}, aún

hay una proporción importante de pacientes que experimenta recaída o resistencia al tratamiento muriendo como consecuencia de las complicaciones de la enfermedad. Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a las drogas quimioterápicas, es la presencia de la glicoproteína P (gp-P) 170 resultante de la expresión del gen MDR-1 sobre las células leucémicas¹². La actividad de la bomba dependiente de energía de la gp-P 170 permite la eliminación de drogas relacionadas y no relacionadas con la quimioterapia, causando resis-

Recibido: 30-IV-2003

Aceptado: 24-VI-2003

Dirección postal: Dra. María Cecilia Tacchi, Servicio de Hematología, Hospital Italiano, Gascón 450, 1181 Buenos Aires, Argentina
FAX: (54-11) 4958-2463 e-mail: Cecilia.tacchi@hospitalitaliano.org.ar

tencia al tratamiento. La exposición a drogas quimioterápicas induce la sobreexpresión de la gp-P 170 en células blásticas¹³, actuando como un mecanismo de defensa adaptativo ante la exposición a un estímulo letal, independiente de que la droga sea sustrato o no de la gp-P 170. La expresión de MDR-1 ha sido identificada como un factor pronóstico independiente adverso para la obtención de remisión completa y sobrevida en pacientes con LMA^{14,20}. Se ha observado que las células leucémicas CD34+ que coexpresan MDR-1 tienen un aumento de la actividad funcional de la gp-P 170, lo que les confiere una mayor resistencia a drogas, correlacionando con una menor respuesta al tratamiento quimioterápico y presencia de niveles elevados de enfermedad residual mínima en pacientes con LMA²¹. El objetivo de este trabajo es valorar el impacto pronóstico de la expresión de MDR-1 en una población de pacientes con LMA tratados en nuestra institución.

Material y métodos

Pacientes: Se evaluó en forma retrospectiva la expresión de MDR-1 en una cohorte de 55 pacientes consecutivos mayores de 16 años, con diagnóstico de LMA, que ingresaron a nuestro hospital desde marzo de 1990 hasta marzo del 2000. Se excluyeron del análisis a los casos que fallecieron antes de ser evaluables para el logro de remisión completa. La edad media fue de 45 ± 14 años, hubo 23 mujeres y 32 varones, 45 LMA fueron primarias y 10 secundarias. Se clasificó a la LMA según los criterios de la French-American-British classification (FAB) y se estableció que hubo: M0: 2 pts, M1: 14 pts, M2: 13 pts, M3: 9 pts, M4-M5: 13 pts, M6: 1 pte, M7: 1 pte y 2 pts con LMA secundaria a mielodisplasia no pudieron clasificarse. Se realizó inmunofenotipificación por citometría de flujo desde 1992 y estudios citogenéticos con técnicas de bandedo habituales. Se consideró el estudio citogenético como de pronóstico favorable (F) cuando tenía: t(15;17), t(8;21) o inv16; intermedio (I): Citogenético normal, trisomía 8, 11q23, y desfavorable (D): alteraciones citogenéticas complejas que comprometen más de 2 cromosomas, monosomía 5 o 7, inv(3q), 20q, 21q, t(6;9), t(9;22).

Tratamiento: Todos los pacientes recibieron tratamiento quimioterápico de inducción con Ara-C 200 mg/m²/día en infusión continua (día 1-7) e idarrubicina 12 mg/m²/día (día 1-3). Se realizó tratamiento de consolidación con alta dosis de Ara-C 2 gr/m²/dosis cada 12 horas (día 1-4) combinada con Mitoxantrona 12 mg/m²/día (día 1-3) (consolidación 1) y VP16 200 mg/m²/día (día 1-5) (consolidación 2). Los pacientes con Leucemia Promielocítica (M3) realizaron inducción con ATRA 45 mg/m² e Idarrubicina 12 mg/m²/d día 6 a 9 y consolidaciones con idarrubicina 12 mg/m²/dosis día 1 a 3. Se consideró remisión completa a la recuperación de la hematopoyesis normal con menos del 5% de blastos en médula ósea y normalización del hemograma. El empleo de trasplante de médula ósea como parte de la terapéutica quedó a decisión del médico tratante según los factores de mal pronóstico que presentaba cada paciente.

Evaluación de MRD-1 y CD34:

Se realizaron cortes histológicos de 5 micrones de espesor de biopsias de médula ósea fijadas en Bouin e incluidas en

parafina para estudios morfológicos de rutina (hematoxilina-eosina, Giemsa, reticulina).

En todas las muestras se cuantificó la proporción de blastos con respecto a la población hematopoyética, empleando criterios morfológicos habituales.

Para evaluar la expresión de MDR-1/Pgp 170 se empleó el anticuerpo monoclonal clon C494 (Signet, EEUU) en una dilución 1:80 en PBS. Este anticuerpo detecta específicamente un epítopo citoplasmático que se expresa únicamente en la proteína MDR-1/Pgp 170 transmembrana y presenta patrón de membrana.

El estudio de la expresión de CD34 se realizó con el anticuerpo monoclonal Qbend10 (Biogenex, EEUU) en una dilución 1:100 en PBS.

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron con la técnica de estreptavidina biotina (sistema Multilink, Biogenex, EEUU) y revelado con diaminobencidina (Biogenex). La contracoloración nuclear fue realizada con hematoxilina.

Se emplearon métodos de recuperación antigénica con citrato de sodio 0.01M en horno de microondas. El procedimiento se realizó en forma automatizada en el instrumento para inmunohistoquímica Optimax 2.6 (Biogenex, EEUU).

La evaluación de la expresión de los marcadores se realizó en los blastos, y fue considerada positiva o negativa (no se evaluó la intensidad de la marcación). Se evaluaron 30 campos de gran aumento (400x) en cada muestra para establecer la proporción de blastos positivos con MDR-1 y CD34 sobre el total de blastos.

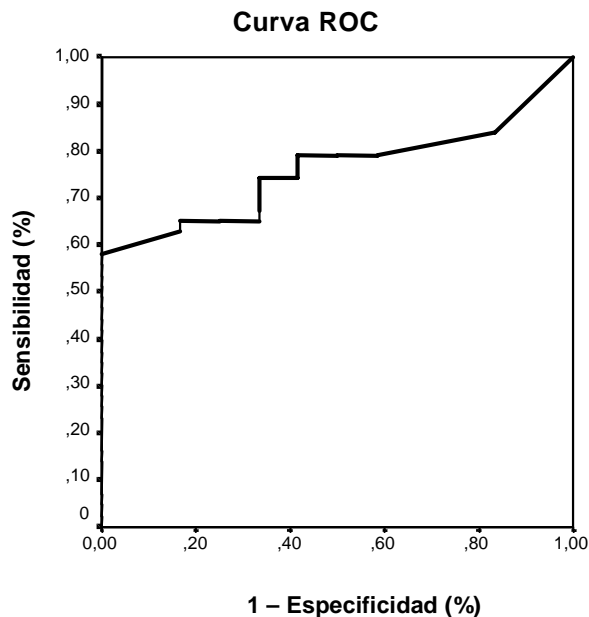
Evaluación: Dado que existen diferentes trabajos con distintas técnicas para evaluar la expresión del MDR-1, se estableció en este trabajo mediante una curva ROC, un valor de corte para la expresión de MDR-1 que resultó significativo para el logro de la remisión. Posteriormente, se correlacionó el MDR-1 con la presencia de factores pronósticos desfavorables para LMA como: edad, LMA secundaria, estudio citogenético desfavorable y leucocitosis. Se evaluó el impacto del MDR-1 sobre las recaídas, sobrevida libre de eventos y sobrevida global.

Estadística: Se utilizó el Chi cuadrado con corrección de Fisher para el análisis de variables no paramétricas, el test de Spearman para correlacionar variables no paramétricas, las variables paramétricas se analizaron utilizando ANOVA considerándose una $p < 0.05$ como significativa. La duración de la remisión (RC) se midió desde la fecha en que se documentó la RC hasta la recaída. Para la duración de la remisión se utilizó el método actuarial de Kaplan y Meier y las comparaciones fueron hechas por log-rank test. Con la finalidad de determinar el valor pronóstico de la expresión de MDR-1 para la sobrevida libre de eventos, se excluyó del análisis a los pacientes que no lograron remisión completa con el tratamiento de inducción y reinducción (8 pacientes).

Resultados

La expresión de MDR-1 demostró tener significación estadística para la obtención de remisión completa según la curva ROC (Fig. 1), con un área bajo la curva 0.76 ($p: 0,006$), siendo el valor de corte significativo para MDR-1 $> 50\%$.

Se realizó una correlación entre la expresión de MDR-1 y otros factores de mal pronóstico en LMA como: edad ($p: ns$), leucocitosis: ($p: 0.002$) por Spearman y LMA secundaria ($p: ns$), LMA M3 ($p: 0.006$), estudios citogenéticos favorables vs no favorables ($p: 0.006$) por ANOVA.



Area	Error Std.	Valor de P	Intervalo de Confianza 95%	
			Límite Inferior	Límite superior
0.76	0.062	0.006	0.637	0.882

Fig. 1.- Evaluación del % de expresión de MDR-1 para el logro de remisión completa por Curva ROC

TABLA 1.- Influencia de los factores pronósticos desfavorables para el logro de remisión completa

	RC	Sin RC	p
Ptes	43	12	
Edad	44 ± 15	49 ± 13	ns
Sexo (F/M)	20/23	3/9	ns
Leucocitos	35312 ± 49767	65610 ± 90854	ns
LMA 1º/2º	36/7	9/3	ns
MDR-1	47 ± 38	85 ± 14	0.001
CD34	28 ± 35	51 ± 35	0.05
Citogenético			
F	11	0	ns
I	14	4	ns
D	3	2	ns
P status*	0.95 ± 0.82	1.0 ± 0.74	ns

*P. Status según ECOG

Se evaluó cuáles de estos factores pronósticos fueron significativos para el logro de remisión completa en esta población (Tabla 1). Los factores pronósticos desfavorables con significancia estadística fueron: la expresión de MDR-1 (p:0.001) y CD34 (p: 0.05), observándose una

mayor tasa de remisión cuando el estudio citogenético es favorable (p: 0.07), siendo leucemias promielocíticas la mayoría de estos casos.

Análisis del MDR-1 según los valores de corte:

Observamos una expresión de MDR-1 en blastos > 50% en 31 de los 55 pacientes evaluables (56.4%). En la Tabla 2 se evalúa la asociación entre la expresión de MDR-1 con variables clínicas y pronósticas de la LMA. Se logró remisión completa (RC) con una inducción en 43 pts (78.1%), 12 pacientes realizaron reintroducción obteniendo RC 5 pts (41.6%). Se observó recaída en 23/48, siendo en el grupo de MDR-1- de 7/24 (29.1%) vs. MDR-1 + 16/24 (66.6%) p: 0.02. En el análisis actuarial por Kaplan Meier para sobrevida libre de eventos (SLE) en 48 pts evaluables se observó una SLE del 21.2% ES: 9.3 con una media de seguimiento de 22 meses (IC 95%: 11-32) para el grupo con MDR-1 + y una SLE de 56.4% ES: 12.5 con una media de seguimiento de 78 meses (IC 95%: 51-105) para MDR-1-, siendo la SLE menor para el grupo que expresa MDR-1 + (p: 0.007 por log rank test) (Fig. 2). La sobrevida global por Kaplan Meier fue mayor en el grupo sin expresión de MDR-1- 41.2% ES:10.1 con

TABLA 2.- Evaluación de la expresión de MDR-1 con variables clínicas y pronósticas de la LMA

	MDR-1 -	MDR-1 +	p
Nº ptes	24	31	
Edad	41 ± 16	48 ± 13	ns
Sexo (F/M)	12/12	11/20	ns
LMA 1º/2º	19/5	26/5	ns
FAB			
M0	0	2	ns
M1	4	10	ns
M2	6	7	ns
M3	8	1	0.006
M4-5	5	8	ns
M6-7	1	1	ns
Inclasif.	0	2	ns
Leucocitos	23032 ± 40535	56152 ± 70777	0.05
Hemoglobina	8.5 ± 2.1	8.9 ± 2.2	ns
Plaquetas	58652 ± 63210	82341 ± 75167	ns
Citogenético			
F*/NF**	8/7	3/16	0.02
CD34(%)	18 ± 30	44 ± 36	0.006
RC (S/N)	24/0	19/12	0.001
Recaída (S/N)	7/17	16/ 8	0.02

* F: Favorable

** NF: No favorable (Intermedio + Desfavorable)

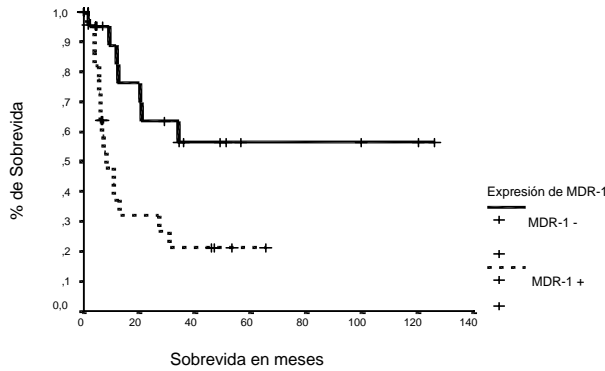


Fig. 2.— Curva de supervivencia libre de eventos según la expresión de MDR-1 en pacientes con LMA

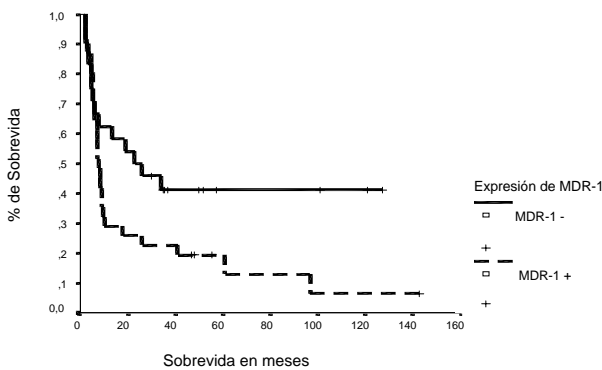


Fig. 3.— Curva de supervivencia actuarial según la expresión de MDR-1 en pacientes con LMA.

una media de seguimiento de 59 meses (IC 95%: 36-82) vs 6.4% ES: 5.7 con una media de 27 meses (IC 95%: 12-41), $p: 0.048$ por log rank test (Fig. 3).

Discusión

La expresión de MDR-1 en las LMA *de novo* ha demostrado ser un factor pronóstico adverso para el logro de la RC y supervivencia libre de eventos¹⁴⁻²⁰.

El desarrollo de mecanismos de resistencia al tratamiento quimioterápico constituye el mayor problema para el manejo de pacientes recaídos o refractarios. Algunos autores han evaluado la expresión de MDR-1 en las recaídas de LMA, encontrando que los pacientes que son refractarios o recaídos expresan más frecuentemente MDR-1 que las LMA *de novo*^{22, 24}. La expresión de MDR-1 en LMA varía desde el 27 al 75 % según lo reportado por diferentes autores^{22-23, 25-31} siendo en nuestro trabajo del 56.4%. Estas diferencias cuantitativas en la expresión del MDR-1 en los diferentes estudios, es el resultado del uso de diferentes técnicas metodológicas y esta-

dísticas en su evaluación. La expresión de MDR-1 se puede analizar utilizando métodos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos, citometría de flujo, métodos que evalúan la función de la bomba de la P-gp 170 midiendo el eflujo de drogas y cuantificación de la expresión del ARN del MDR-1 o el ARN mensajero (ARNm) por reacción de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR)³²⁻³⁴. La obtención de un valor de corte significativo para la expresión del fenotipo MDR-1+ no está claramente establecida; varios autores han establecido diferentes valores de corte: 5%^{23, 30, 35}, 20%^{28, 36, 37} y 30%²⁹ de células leucémicas positivas. Sin embargo, la utilización de estos valores de corte pre-establecidos en forma arbitraria pueden no contribuir en forma significativa al pronóstico. Por este motivo, establecimos para nuestra cohorte un valor que correlacionara el porcentaje de células positivas para la expresión de MDR-1 con la respuesta al tratamiento quimioterápico, observando mediante la realización de una curva ROC que el valor de corte significativo es $>$ al 50%. De manera similar que en otros trabajos, no se encontró asociación significativa entre la expresión de MDR-1 con edad y sexo. Se encontró una correlación significativa entre la expresión de MDR-1+ y la leucocitosis ($p: 0.05$), en concordancia a lo reportado por otros autores^{28, 36}. También se observó correlación en la co-expresión de MDR-1+ y CD34+ en células leucémicas ($p: 0.006$), esta asociación reportada en la literatura disminuye la respuesta al tratamiento, encontrándose niveles elevados de enfermedad residual mínima en estos pacientes^{29, 38-40}. La falta de expresión de MDR-1 se encontró asociada a estudios citogenéticos favorables ($p: 0.02$), especialmente a la presencia de t(15; 17) característica de la leucemia promielocítica ($p: 0.006$), como ha sido documentada en otras series de casos^{28, 41, 42}. En nuestro trabajo, la expresión de MDR-1 ha demostrado ser un factor pronóstico de resistencia a la quimioterapia, observándose en estos pacientes una menor tasa de remisión completa ($p: 0.001$), resultados similares a los publicados por otros autores^{14, 28, 29, 37}. La menor duración de la RC en los pacientes con expresión de MDR-1 se debe a la presencia de una mayor enfermedad residual post-tratamiento, lo que se evidencia en una mayor tasa de recaída ($p: 0.02$), una menor supervivencia libre de eventos ($p: 0.007$) y una menor supervivencia global ($p: 0.048$).

En conclusión, creemos que la detección del fenotipo MDR-1+ a través de la gp-P 170 permite identificar a los pacientes que pueden resultar resistentes al tratamiento clásico de inducción en leucemias mieloblásticas agudas *de novo*. Esta información permitiría modificar la estrategia terapéutica a implementar en estos casos, utilizando agentes que bloqueen la función de la gp-P 170 o drogas con niveles intracelulares que no estén modificados por esta bomba. Los trabajos realizados con drogas como el PSC-833^{43, 44} que modulan la actividad de la bom-

ba gp-P 170 han demostrado incrementar la toxicidad de los regímenes empleados, lo que dificulta el uso de estos agentes, pero aún la experiencia en la modulación de la bomba es bastante limitada. La mayor tasa de recaída observada para el subgrupo de pacientes con expresión de MDR-1 que logra remisión completa, requeriría la implementación de otras alternativas terapéuticas en función del nivel de enfermedad residual mínima, para obtener mejores resultados.

Bibliografía

1. Wiernik PH, Banks PL, Case DC, et al. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1992; 79: 313-9.
2. Burnett AK, Goldstone AH, Milligan DW. Daunorubicin versus Mitoxantrone as induction for AML in younger adults given intensive chemotherapy: preliminary results of MRC AML12 Trial. *Br J Haematol* 1999; 105 (Suppl. 1): 67(a).
3. Hansen OP, Pedersen-Bjergaard J, Ellegaard J, et al. Aclarubicin plus cytosine arabinoside versus daunorubicin plus cytosine arabinoside in previously untreated patients with acute myeloid leukemia: a Danish National Phase III Trial. The Danish Society of Hematology Study Group Leukemia on AML, Denmark. *Leukemia* 1991; 5: 510-6.
4. Wheatley K. A systemic collaborative overview of randomised trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1998;103: 100-9.
5. Bishop JF, Matthews JP, Young GA. A randomized trial of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87: 1710-7.
6. Rowe JM, Tallman MS. Intensifying induction therapy in acute myeloid leukemia: Has a new standard of care emerged? *Blood* 1997; 90: 2121-6.
7. Mayer RJ, Davies RB, Schiffer CA, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994; 331: 896-903.
8. Wolff SN, Herzig RH, Fay JW, et al. High-dose cytarabine and daunorubicin as consolidation therapy for acute myeloid leukemia in first remission: long-term follow-up and results. *J Clin Oncol* 1989; 9: 1260-7.
9. Harousseau JL, Cahn JY, Pignon B, et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90: 2978-86.
10. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *Lancet* 1998; 351: 700-8.
11. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1051-62.
12. Maxwell Nørgaard J, Hokland P. Biology of Multiple Drug Resistance in Acute Leukemia. *Int J Hematol* 2000; 72: 290-7.
13. Hu XF, Slater A, Kantharidis P, et al. Altered multidrug resistance phenotype caused by anthracycline analogues and cytosine arabinoside myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 4086-95.
14. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in *de novo* acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87: 1997-2004.
15. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multi-drug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997; 89: 3323-9.
16. Van den Heuvel-Eibrink MM, van der Holt B, Boekhorst PA, et al. MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in *de novo* acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 99: 76-83.
17. Van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38: 94-110.
18. Willman CL. The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia: studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program. *Semin Hematol* 1997; 34 (Suppl 5): 25-33.
19. Hunault M, Zhou D, Delmer A, et al. Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia: major prognostic significance for *in vivo* drug resistance to induction treatment. *Ann Hematol* 1997; 74: 65-71.
20. Michieli M, Damiani D, Ermacora A, et al. P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in *de novo* acute non-lymphocytic leukaemias: biological and clinical implications. *Br J Haematol* 1999; 104: 328-35.
21. Basso G, Lanza F, Orfao A, Moretti S, Castoldi G. Clinical and biological significance of CD34 expression in acute leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15: 68-78.
22. Musto P, Melillo L, Lombardi G, et al. High risk of early resistant relapse for leukaemic patients with presence of multidrug resistance associated P-glycoprotein positive cells in complete remission. *Br J Haematol* 1991; 77: 50-3.
23. Zhou DC, Marie JP, Suberville AM, Zittoun R. Relevance of *mdr1* gene expression in acute myeloid leukemia and comparison of different diagnostic methods. *Leukemia* 1992; 6: 879-85.
24. List AF. Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 937-42.
25. Sato H, Gottesmann MM, Goldstein LJ, et al. Expression of the multidrug resistance gene in myeloid leukemias. *Leukemia Res* 1990; 14: 11-21.
26. Pirker R, Wallner J, Geissler K, et al. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *JNCI* 1991; 83: 708-12.
27. Gekeler V, Frese G, Noller R, et al. MDR1/P glycoprotein, topoisomerase, and glutathione-S-transferase, p. gene expression in primary and relapsed acute adult and childhood leukaemias. *B J Cancer* 1992; 66: 507-17.
28. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, et al. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 1992; 79: 473-6.
29. Boekhorst PAW, Leeuw K, Schoester M, et al. Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ leukemia cells. *Blood* 1993; 82: 3157-62.
30. Ino T, Miyazaki H, Tsogai M, et al. Expression of P-glycoprotein in *de novo* acute myelogenous leukemia at initial diagnosis: Results of molecular and functional assays, and correlation with treatment outcome. *Leukemia* 1994; 8: 1492-7.

31. Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ et al. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia (AML) by multi-parameter flow cytometry. Identification of discordant MDR±/efflux+ and MDR+/efflux± cases. *Blood* 1995; 86: 2329-42.
32. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* 1996; 56: 3010-20.
33. Filipits M, Suchomel RW, Lechner K, Pirker R. Immunocytochemical detection of the multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein in acute myeloid leukemia: impact of antibodies, sample source and disease status. *Leukemia*. 1997;11: 1073-7.
34. Marie JP, Huet S, Faussat AM, et al. Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. French Network of the Drug Resistance Intergroup, and Drug Resistance Network of Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. *Leukemia*. 1997; 11: 1086-94.
35. Zochbauer S, Gsur A, Brunner R, Kyrle PA, Lechner K, Pirker R. P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 974-7.
36. Del Poeta G, Stasi R, Venditti A, et al. Prognostic value of cell marker analysis in *de novo* acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 388-94.
37. Wood P, Burgess R, Macgregor A, Liu Yin JA. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. *Br J Haematol* 1994; 87: 509-14.
38. Legrand O, Perrot J, Baudard M, et al. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000; 96: 870-7.
39. Aglietta M, Lanza F, Lemoli R, Menichella A, Tafuri R, Tura S. Peripheral blood stem cells in acute myeloid leukemia: biology and clinical applications. *Haematologica* 1996; 81: 77-92.
40. San Miguel J, Martinez A, Macedo, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; 90: 2465-70.
41. Zochbauer S, Haas OA, Schwarzingler I, Lechner K, Pirker R. Multidrug resistance in acute myeloid leukemia with inversion of chromosome 16 or FAB M4Eo subtype. *Lancet* 1994; 344: 894.
42. Paietta E, Andersen J, Racevskis J, et al. Significant lower P-glycoprotein expression in acute promyelocytic leukemia than in other types of acute myeloid leukemia: immunological, molecular and functional analyses. *Leukemia* 1994; 8:968-73.
43. Baer MR, George SL, Dodge RK, et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002; 100: 1224-32.
44. Sonneveld P, Burnett A, Vossebeld P, et al. Dose-finding study of valspodar (PSC 833) with daunorubicin and cytarabine to reverse multidrug resistance in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *Hematol J* 2000; 1: 411-21.
45. Lazarowski AJ. GP-170 glycoprotein and resistance to chemotherapy. *Medicina (Buenos Aires)* 1991; 51: 279-80.
46. Nucifora E, Fantl D, Goldstein S, Kusminsky G. Acute promyelocytic leukemia: experience with trans retinoic acid in Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 333-8.

It is ironic even though we know so much more about the molecular nature of tumor antigens and the mechanism by which synthetic and recombinant vaccines generate immunity, our clinical results are not yet nearly so impressive as Jenner's original smallpox vaccine.

Resulta irónico que a pesar que sabemos tanto acerca de la naturaleza molecular de las vacunas y del mecanismo según el cual vacunas sintéticas y recombinantes generan inmunidad, nuestros resultados clínicos distan mucho de ser tan impactantes como los de la vacuna original de Jenner contra la viruela.

Drew Pardoll

Cancer vaccines: A road map for the next decade.
Current Opinion in Immunology 1996; 8: 619