

302827
N:5
2Ej



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

con estudios incorporados a la U.N.A.M.

REVISION Y ACTUALIZACION DE LOS
MECANISMOS DE RESISTENCIA DE
CELULAS CANCEROSAS ANTE FARMACOS

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

SERGIO OSCAR CAMPOS GOMEZ

México, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas 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 imágenes, 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 donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A G R A D E C I M I E N T O S

POR SUS SABIOS CONSEJOS Y SU CARINO.

A LA Q.F.B. GRACIELA SOSA GARCIA.

POR SU APOYO INCONDICIONAL.

A LOS PROFESORES.

BENJAMIN NOGUEDA TORRES.

RICARDO ALEJANDRE.

POR SU GRAN AMISTAD Y AYUDA INCONDICIONAL CON LA CUAL DIA
A DIA MOTIVO MI FORMACION.

A LA Q.F.B. DULCE MA. ROBLES DENETRO

EN MEMORIA A LOS PROFESORES QUERIDOS QUE DIERON SU SABER
A CADA UNO DE NOSOTROS COMO ESTUDIANTES Y QUE HOY EN LA
GLORIA DE DIOS ESTEN.

A LOS PROFESORES.

MORALES.

TORTOLERO.

DEDICO ESTA META A QUIENES ME DIERON LA VIDA ES DECIR A MIS PADRES. FRANCISCO CAMPOS Y AMPARO GOMEZ NO ENCONTRANDO PALABRAS SUFICIENTES DE AGRADECIMIENTO. SIN EMBARGO DIA A DIA AUN MOTIVAN MI EXISTENCIA CON LAS PALABRAS "RECUERDA HIJO EN ESTA VIDA SOMOS LO QUE QUEREMOS SER".

A MIS HERMANOS. EDUARDO, JAVIER, PATRICIA Y JOEL POR LA MANERA QUE ME VEN Y PROTEGEN CON SU FORMA DE SER.

AL SER AMADO QUE ENCONTRE EN MI CAMINO Y QUE DE MANERA INCONDICIONAL SE INTEGRO A MI VIDA IMPULSANDOME A LLEVAR A CABO ESTA TAREA QUE JUNTOS TERMINAMOS. ES DECIR A MI ESPOSA ROSA MARIA.

A MIS PEQUEÑOS JOSE, NANCY Y SERGIO QUIENES ESPERO QUE CUANDO TENGAN USO DE RAZON, SUPEREN MIS METAS YA QUE CUANDO PLANEEEN ALGO LO HAGAN CON AMOR Y DEDICACION PORQUE ASI LO DESEARON.

EN FIN A TODOS MIS PARIENTES POR SU GRAN COMPRESION, CARINO E INTERES, JOEL, PETRA, LETYS, MARIANA, GUADALUPE Y GONZALO GRACIAS MIL.

HOY ESTOY POR DAR NUEVAMENTE UNA VUELTA MAS A UNA PAGINA DE MI VIDA. PERO ANTES DESEO EXTERNAR ESTE PENSAMIENTO.

CUANDO ENCONTRE MI CAMINO LO HALLE DIFICIL. PERO NO QUISE OTRO. YA QUE PARA DAR EL JUSTO MEDIO A CADA UNA DE MIS TAREAS ES - DECIR SER HIJO, PADRE, EMPLEADO Y ESTUDIANTE A LA VEZ, LLEGUE A DUDAR DE MI CAPACIDAD. TAREA UN TANTO DIFICIL PERO NO IMPOSIBLE, MISMA QUE UNA Y OTRA VEZ A MITAD DE LA NOCHE ME SENTI SOLO, CON LA MIRADA FIJA SOBRE MIS LIBROS APARECIENDO DE ENTRE LAS LETRAS LA IMAGEN DE DIOS, MISMA QUE EN TODO MOMENTO ME PERMITIA AVANZAR Y COMENTANDOLE SE HICIERA SU VOLUNTAD.

SIN EMBARGO A VECES PIENSO QUE BUSCAMOS SER ANTE EL MUNDO Y SOLO SOMOS ANTE NOSOTROS MISMOS. YA QUE QUIEN SE ARRASTRA PARA VENCER ENCUENTRA ALTO EL PEDESTAL.

POR ULTIMO DOY GRACIAS A DIOS POR HABERME PERMITIDO DAR VUELTA A ESTA PAGINA DE MI VIDA.

Para la realización del presente trabajo se realizó una investigación bibliográfica en las siguientes bibliotecas:

Biblioteca de la Facultad de Química, UNAM
Hemeroteca del Hospital General de México,
Hemeroteca del Centro Médico Siglo XXI del Seguro Social, Hemeroteca del Hospital General Juárez, Biblioteca del Instituto Nacional de Cancerología, Hemeroteca del Instituto Nacional de la Nutrición, Biblioteca del Hospital General la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A los responsables de estos Centros de Información les estoy agradecido por las facilidades que me brindaron, así como al Profr. Benjamín Noguera Torres por su asesoría.

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre el estado que guarda el avance en el conocimiento de la problemática de la resistencia de células cancerosas ante agentes quimioterapéuticos y su implicación en el paciente.

INDICE

Pág.

I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	
2.2.1 La célula cancerosa	4
2.2.2 Transformación en las células neoplásicas	6
2.3.1 La quimioterapia contra el cáncer	10
2.3.2 Cinética del comportamiento quimioterápico contra el cáncer.	11
2.3.3 Principio al estudio de la resistencia a los quimioterápicos	12
2.3.4 Propiedades comunes de los quimioterápicos	14
2.4.1 Fármacos antitumorales	18
2.4.2 Antimetabolitos	19
2.4.3 Agentes alquilantes	20
2.4.4 Antibióticos antitumorales	21
2.4.5 Alcaloides antitumorales	22
2.4.6 Otros agentes antitumorales	23
III. RESISTENCIA DE CELULAS TUMORALES ANTE FARMACOS	
3.1.1 Retención y acumulación de fármacos en la célula tumoral.	24
3.1.2 Cambios a nivel de membrana	25
3.1.3 Relación entre proteínas bacterianas de transporte y glucoproteína-P	28
3.1.4 Relación del transporte de fármacos con el ATP.	30
3.1.5 Diseños empleados para el funcionamiento de la glucoproteína-P	32
3.1.6 Distintas propiedades celulares relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos	35

3.1.7 Relación de baja resistencia mediante agentes específicos.	39
IV. ASPECTOS GENETICOS DE CELULAS TUMORALES ANTE LA RESISTENCIA A MULTIPLES FARMACOS	
4.1.1 Hallazgo de los genes asociados con la resistencia a múltiples fármacos.	45
4.1.2 Amplificación genética de las células resistentes a múltiples fármacos.	47
4.1.3 Determinación de transcritos correspondientes a la glucoproteína-P.	52
V. CONCLUSIONES	54
VI. BIBLIOGRAFIA	58

CAPITULO I

INTRODUCCION

En un principio el estudio y uso de fármacos contra el cáncer, se realizaba puramente al azar. Esto presentaba dos grandes problemas: la repetición de compuestos ya cribados y el estudio de sustancias análogas a citostáticos con actividad conocida (en lugar de identificar nuevas estructuras). Tras el refinamiento que alcanzaron los conocimientos sobre biología celular, química, farmacología y bioquímica, los compuestos entran actualmente en el programa de cernimiento del Instituto Centro Nacional (Screening of National Center Institute) empleando como modelo experimental a la leucemia L1210 de los roedores. Llegando a 40,000 compuestos anuales en 1975 y hasta 15,000 en los últimos años.

Actualmente se emplea la leucemia murina P 388, siendo que cualquier agente que demuestre actividad en esta neoplasia pasa al panel de tumores, mismos que son sometidos a un estudio cruzado para averiguar su actividad frente a un panel compuesto por diez tumores humanos mediante cultivos en agar blando o implantes subcutáneos. Para posteriormente entrar en las fases preclínicas antes de ser aprobadas en el humano.

El tiempo medio entre el descubrimiento de un agente antitumoral efectivo y la comercialización de dicho agente es por desgracia, largo (alrededor de 10-12 años).

Mientras que la efectividad de un fármaco se detecta en los ensayos de fase II, las fases III y IV, establecen su lugar en el arsenal terapéutico. Sin embargo sólo 1 de cada 40,000 compuestos probados resulta efectivo para ser usado en clínica. Los costos del estudio preclínico de compuestos sintéticos, productos de fermentación y derivados de plantas alcanzaron la media de 547,000 - 677,000 y 677,000 dólares, respectivamente en 1984. Los estudios clínicos por medio de ensayos de fase II añaden un costo medio de 1.5 millones de dólares al costo preclínico de cada fármaco. Así, el desarrollo de un citostático que sea útil tras los ensayos de fase II cuestan unos 2 millones de dólares. (de Vita, 1990).

Después de este análisis económico previo, surge un problema muy serio que es la resistencia a fármacos dicho de otra manera, no es mas que el desaliento y no el fracaso a la terapia contra el cáncer. Ya que mediante el presente estudio se puede determinar los avances y perspectivas a futuro.

Al observar este fenómeno en el campo clínico, se encuentra que el tratamiento inicial de un paciente con cáncer resulta adecuado, pero los subsecuentes tratamientos son progresivamente - menos fructíferos.

El estudio de la resistencia frente a múltiples fármacos es de importancia en la oncología debido a la gran cantidad de individuos afectados por los diversos procesos malignos y la problemática que se presenta cuando las células tumorales de estos individuos presentan resistencia al encontrarse bajo quimioterapia.

De acuerdo a lo establecido el presente estudio se desglosa de la siguiente manera:

-Resistencia cruzada frente a fármacos no relacionados, estructural ni funcionalmente, (Skousgaard, 1978).

-Disminución en la acumulación intracelular del fármaco, (Inaba, 1979).

-Expresión aumentada de un a glucoproteína en la membrana plasmática, la cual está asociada con la resistencia a múltiples fármacos, (Glucoproteína-P) (Cummings, 1993).

-Amplificación y expresión del gene que codifica para la glucoproteína-P, (Watanabe, 1993).

Se ha observado además la existencia de otros cambios celulares asociados a la resistencia frente a múltiples fármacos -- tales como:

-Presencia de una protefna pequeña de baja masa molecular denominada sarcina V - 19 o P 21, (Stoclet, 1981).

-Alteración en la actividad de enzimas, (Bradley, 1988).

-Incremento en la reparación de lesiones citotóxicas, (Wilson, 1989).

C A P I T U L O I I

GENERALIDADES

2.2.1 LAS CELULAS CANCEROSAS

Ninguna palabra en todo el léxico de la medicina despierta más terror que el nombre "Cáncer". Cáncer es el nombre común para todos los tumores malignos. La palabra cáncer tiene origen muy antiguo, que depende de comparar al cangrejo con estas masas neoplásicas que se sujetan tercamente, "algunos dicen que se llama así porque se adhiere a cualquier parte de la que hace presa de manera obstinada como un cangrejo". Sin embargo, la larga historia a hecho sinónimos tumor y neoplasia, y otras asepsiones de la palabra tumor han caído en desuso. Por ejemplo: la oncología (oncología = tumor) es el estudio de los tumores o más exactamente, el estudio de las neoplasias.

Los calificativos benigno y maligno, según se aplican a neoplasias, tienen deducciones clínicas. La designación benigno significa que la lesión no amenaza la vida, es de crecimiento comparativamente lento, no se diseminará por el cuerpo (no dará metástasis) y es susceptible de extirpación con cura del paciente. Es raro que una neoplasia benigna cause la muerte y en este caso es por virtud de su sitio estratégico o su función.

En cambio, casi todas las neoplasias malignas tienen las potencialidades desagradables de crecimiento rápido, invasión y destrucción de tejidos adyacentes y diseminación en todo el cuerpo, que origina la muerte (Robbins, 1985).

Los estudios fundamentales sobre tumores malignos se basan en el estudio de cánceres espontáneos, y el valor último de cualquier resultado o teoría reside en su influencia o utilidad para prevenir o erradicar las neoplasias. Sin embargo las investigaciones in vivo, no han proporcionado una clara visión acerca de cómo se desarrolla el cáncer, cuáles son sus características básicas o cómo puede ser curado.

Esto ocurre en gran parte porque el problema es extremadamente difícil. Pero también debido a que los experimentos incisivos, con controles rigurosos y protocolos variados, difícilmente

pueden llevarse a cabo en pacientes con enfermedades diferentes, - definidas de forma incompleta e irreproducibles.

Algunos de estos problemas persisten incluso cuando se estudian tumores transplantados en animales vivos. Por ello el cáncer se investiga a tres niveles: orgánico, celular y subcelular, - (Campisi, 1984).

Los experimentos in vitro tienen su precio. Siendo que no debería nunca apartarse de la realidad hasta el punto de perder su fin último: es una ayuda para prevenir la enfermedad o mejorar el tratamiento, recordando que la utilidad de un resultado puede - no ser evidente inicialmente.

Uno de los principales motivos para estudiar el cáncer, aislado del resto del organismo es que la neoplasia se concibe como una sóla célula alterada. Dos tipos de pruebas señalan que los elementos esenciales del crecimiento incontrolado in vivo radican en la célula misma. En primer lugar, una célula procedente de un tumor. En segundo lugar, se ha demostrado que muchos tumores tienen un carácter clonal, (Skipper, 1960, Fialkow, 1977).

A medida que las células crecen y se dividen, aparecen - generalmente estadios progresivos, desde la neoplasia a la tumoración maligna. Las morfologías alteradas en los tejidos tumorales, que son básicas para la identificación de la célula como maligna por parte de los patólogos son: cambios de las estructuras cromosómicas constantes que son característicos de las células normales, y propiedades bioquímicas alteradas. Estos últimos cambios se ponen de manifiesto normalmente como una pérdida de las características diferenciales específicas y una regresión a patrones más embrionarios. Las células tumorales pueden también ganar nuevas propiedades tales como la alteración de los modelos enzimáticos en los feocromocitos, que producen una sobreproducción de catecolaminas. La comprensión de la anaplasia está, por tanto, en estricta dependencia y conexión con la comprensión de la diferenciación - y bioquímica celular normales, (Bramwell, 1983).

La diferencia entre las neoplasias son ya demostradas claramente sólo por la variedad de respuestas que presenta a la quimioterapia. La capacidad de cambio de una neoplasia queda ilustrada por el rápido desarrollo de resistencia frente a los fármacos. Además una sola masa neoplásica puede diferir en el seno de ella misma en forma notable, incluyendo la resistencia a los fármacos antineoplásicos.

Un tumor puede desarrollarse en semanas, mientras que otro evoluciona en varios años.

La evolución in vivo de una célula hacia una neoplasia clínicamente es un hecho extremadamente raro, aunque la incidencia de cáncer en la población humana sea alta. Un adulto tiene más de 10^{14} células, y a lo largo de la vida produce unas 10^{16} . Aún así - la probabilidad de que una de estas células se convierta en una neoplasia letal en 70 años es menor del 50%. Los mecanismos de vigilancia inmune pueden impedir la aparición manifiesta de la neoplasia, (Kato, 1982).

2.2.2 TRANSFORMACION EN LAS CELULAS NEOPLASICAS

En muchos sentidos, la célula cancerosa plenamente desarrollada es un microcosmos biológicamente muy distinto de la célula normal. Ha adquirido la capacidad patente para escapar a controles reguladores, lo cual le brinda aumento del potencial de crecimiento y mayor grado de autonomía, esto se traduce como la transformación neoplásica, nombre que abarca la suma de las modificaciones mostradas por las células cancerosas. La transformación pudiera definirse como un cambio fenotípico en las células que es pasado de las precededoras a las descendientes y se caracteriza por lo siguiente:

1. Cambios morfológicos. Las células transformadas adquieren, en mayor o menor medida, las alteraciones morfológicas en las dimensiones y el aspecto celular nuclear incluidas general --

mente por el nombre de anaplasia.

2. Susceptibilidad de transplante. La mayor parte de las células transformadas pueden transferirse fácilmente a cultivos adecuados in vitro o introducirse en huéspedes singénicos adecuados en los cuales producen tumor. En cambio, es difícil lograr cultivo de células humanas normales diferenciadas (el fibroblasto es excepción notable).

3. La disminución de la sensibilidad a la inhibición por contacto. Las células transformadas suelen ser mucho más móviles que las equivalentes normales y menos sujeta a la inhibición por contacto, esto es, a la cesación del movimiento una vez que las células se ponen en contacto. El fenómeno de inhibición que depende de la densidad.

4. Disminución de la sensibilidad a la inhibición del crecimiento que depende de la densidad. Las células transformadas se apilan de manera desorganizada que excede de la etapa confluyente monocelular a causa de la duplicación continuada, lo cual produce mayor densidad celular en cultivo. La pérdida de la inhibición del crecimiento que depende por contacto, bien pudiera potenciar el crecimiento del cáncer en los tejidos.

5. Pérdida de la dependencia del anclaje o fijación para el crecimiento. Casi todas las células transformadas tienen la facultad de dividirse en medios semisólidos, incluso líquidos, en tanto que las células normales que pueden mantenerse en cultivo sólo crecerán cuando se fijan a superficies sólidas.

6. Capacidad infinita para sobrevivir y reproducirse. Las células transformadas en cultivo adecuado pueden mantenerse en cultivo adecuado, pueden mantenerse indefinidamente como líneas celulares tumorales; por ejemplo: las células de ascitis de Erlich representan una línea celular tumoral humana estándar que se ha -

mantenido en cultivo durante años. Originalmente se obtuvo hace - varios decenios de una muestra de biopsia de un cáncer cervical.

Oncogenicidad. La prueba crítica y última de transformación es la capacidad de producir neoplasias al sembrarse en hués - pedes singénicos adecuados.

8. Otros cambios. Muchas otras modificaciones, que inclu - yen propiedades de la superficie, nuevos antígenos. Modificaciones bioquímicas y anomalías cariotípicas también se observan en las cé - lulas transformadas, (Robbins, 1985).

Estos cambios pueden ser acentuados por los tratamientos contra las células malignas, tal como se observa en el desarrollo de células tumorales resistentes a agentes quimioterapéuticos.

Las características principales del comportamiento de - las células tumorales son probablemente consecuencia de modifica - ciones en la superficie celular, ya que en el tumor estas modifica - ciones contribuyen indudablemente al escape de muchos de los fac - tores que mantienen a las células normales bajo control, (Dar - nell, 1986).

El crecimiento continuo del cáncer depende no sólo de - las características de la célula maligna, sino también de condi - ciones compatibles con su supervivencia, encontrándose entre ellas, una adecuada irrigación sanguínea.

Aún cuando en la mayoría de las células tumorales exis - ten características comunes, al ser comparadas las provenientes de diferentes tejidos, se presentan variaciones en su comportamiento bioquímico.

Otro aspecto de las células malignas, que se ha recono - cido y que sin embargo no está completamente esclarecido, es su - capacidad para evadir al sistema inmunológico.

Cabría esperar que las alteraciones en la estructura ce -

lular asociadas al proceso maligno deben dirigirse al sistema inmunológico al reconocimiento de las células tumorales, ya que en la circulación sanguínea se encuentran células asesinas (Killer), las cuales pueden reconocer a muchos tipos de células tumorales, sin afectar a las células normales.

A pesar de esto, las células tumorales han encontrado formas de evadir la dirección inmunológica; entre ellas se encuentra el enmascaramiento de antígenos de superficie, que de otra manera serían marcadores que servirían para su destrucción. (Stites, 1985, Niederle, 1993).

2.3.1 LA QUIMIOTERAPIA CONTRA EL CANCER

Paul Erlich estableció el término "Quimioterapia" Para el uso de un fármaco de composición conocida que trataba la parasitosis. Entre 1903 y 1915 dedicó la mayor parte de su atención al desarrollo de agentes quimioterápicos, del mismo modo como hoy se identifican fármacos anticancerosos.

Con la ayuda de un químico orgánico y el apoyo de la industria farmacéutica, Erlich sintetizó una larga serie de compuestos orgánicos de arsénico y los probó en animales de experimentación. El derivado 606 demostró ser efectivo no sólo contra las infecciones por tripanosoma, sino también (para su sorpresa) contra la sífilis del conejo, llamándolo Salvarsan (el salvador de la humanidad).

En los años 30 se descubrieron los primeros agentes quimioterápicos útiles contra las infecciones bacterianas. Tales como las sulfanilaminas y la penicilina. Sin embargo las investigaciones del tratamiento del cáncer ganó importancia a principio de siglo con tres líneas principales de investigación. La primera fue el desarrollo de los principios de la cirugía oncológica que llevaron a Halsted en 1894 a proponer la resección en bloque como parte de una operación de cáncer, concretamente la mastectomía radical. Aproximadamente, al mismo tiempo Röntgen descubrió los rayos X y ofreció a los médicos un segundo método para tratar el cáncer localizado.

El tercer avance tuvo sus raíces en el trabajo de Paul Erlich. Su uso de modelos con roedores para las enfermedades infecciosas llevó a George Clowes, de Roswell Park Memorial Institute de Buffalo, a desarrollar nuevas cepas de los roedores que podían transmitir tumores de los roedores trasplantados, a principio de siglo. Tales modelos han servido desde entonces como campo de experimentación de potenciales agentes quimioterápicos del cáncer.

La quimioterapia del cáncer es el tratamiento de las

metástasis. La capacidad de curar el cáncer con medidas locales - (cirugía y radioterapia) está limitada por la presencia de metástasis viables fuera del campo de tratamiento, realidad ésta que no fué comprendida hasta las dos últimas décadas. Los tumores - con capacidad de invadir el estroma circundante y atravesar las membranas basales siempre desprenden células al mismo tiempo que - van creciendo. Algunas de estas células son capaces de establecer clonas metastásicas, (Tannock, 1983).

2.3.2 CINÉTICA DE COMPORTAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO CONTRA EL CÁNCER

El tiempo de duplicación de las bacterias es aproximadamente de 2 horas. Existiendo por lo tanto diferencias cualitativas entre las células bacterianas y las humanas, que son fundamentales en la acción de los citostáticos. Así, la presunción de que el tratamiento del cáncer podría ser tan simple como el de las infecciones bacterianas confundiendo a los investigadores durante la - década de los 50. Además, la aplicación directa al hombre de algunos datos obtenidos en los roedores causó aún más dificultades .

En la cinética de orden cero, una dosis dada del fármaco antineoplásico eliminará un número constante de células. Independientemente de la masa total. Los primeros estudios con antibióticos y citostáticos se realizaron de este modo. Al administrar una dosis fija del fármaco sin tener en cuenta el volumen de la población diana, se estaba asumiendo que el medicamento eliminaba las bacterias o las células tumorales siguiendo una cinética de orden cero. Skipper demostró que los fármacos anticancerosos - mataban las células tumorales con una cinética de primer orden, - es decir una determinada dosis de fármaco matará una fracción - constante de la población de células independientemente de su cantidad total (antes de esto se suponía la existencia de una cinética de orden cero), con una cinética de orden cero, una dosis de fármaco habría matado un número fijo de células . Con una - - -

reacción de primer orden, una dosis de fármaco que reduce una población de 100,000 células a una célula dejará 1,000 células residuales si había 10^9 células al principio del tratamiento, (suponiendo que la población tuviera una fracción de crecimiento equivalente y un mismo número de cepas celulares sensibles y resistentes). Por tanto, la probabilidad de erradicar un cáncer es mayor cuando el tamaño de la población es pequeño. Esto es particularmente que la fracción de crecimiento aumenta con la disminución del tamaño tumoral o al contrario, cuando la masa tumoral aumenta, el crecimiento disminuye por una reducción de la fracción de crecimiento. El crecimiento exponencial en los tumores grandes se equilibra, con un retardo exponencial del crecimiento (curva de crecimiento Gompertziana). Sin embargo, las diferencias cinéticas por sí solas no han proporcionado nunca una explicación adecuada de la incapacidad de los citostáticos para eliminar grandes masas tumorales, (Skipper, 1964, Simpson, 1974).

2.3.3 PRINCIPIO AL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LOS QUIMIOTERAPICOS

En 1943 Luria y Delbruck describieron un principio de genética bacteriana, que es importante para comprender la quimioterapia del cáncer. Estos autores notaron que la *Escherichia coli* no se hacía resistente al bacteriófago porque sobreviviera a su exposición, sino porque desarrollaba colonias de bacterias que habían mutado espontáneamente hacia un tipo con resistencia intrínseca a la infección. En 1979, Goldie y Coldman aplicaron este principio al estudio de la aparición de células tumorales con resistencia a los quimioterápicos. Las alteraciones citogenéticas no aleatorias que presentan muchos tumores humanos están probablemente muy relacionadas con cierta capacidad para resistir la acción de los citostáticos.

El modelo de Goldie y Coldman también relacionó la mutación espontánea hacia la quimiorresistencia con la masa tumoral.

Estos autores concluyeron que la probabilidad de encontrar una línea celular quimiorresistente era ya muy elevada antes de que la población alcanzase 10^6 células, asumiendo una tasa de mutación del orden 10^6 mayor, por lo que la exposición al citostático sería ineficaz, la incurabilidad se explicaría por la aparición de cepas biorresistentes, también con volúmenes tumorales mínimos.

Por primera vez, el modelo de Goldie y Coldman proporciónó las bases de la relación inversa que siempre existe entre la posibilidad de conseguir la curación con citostáticos y el número de células tumorales, independientemente de la cinética del crecimiento tumoral. Estas observaciones poseen implicaciones importantes cuando se aplican al tratamiento de los tumores humanos.

Explican la mayor efectividad de la poliquimioterapia frente a la monoterapia cuando ambas se utilizan contra poblaciones tumorales con fracción de crecimiento constante. Dado que el número y la fracción de células quimiorresistentes están relacionados con la masa tumoral, es fácil comprender que los pacientes con metástasis diseminadas posean mayor número de células multiresistentes. Además la fórmula de Goldie y Coldman indica que tal resistencia puede aparecer ya cuando el crecimiento tumoral es sólo de 2 logaritmos (alrededor de seis duplicaciones), ya que puede ocurrir en sólo 2-4 semanas. Así pues, el retraso en el inicio del tratamiento puede tener gran importancia. Esta hipótesis explica también dos hechos que suelen observarse en la práctica. En primer lugar, el fracaso de la quimioterapia para obtener respuestas diseminadas. En segundo lugar, dado que la tasa de mutación de un tumor puede variar de un paciente a otro, explica también las diferencias en la respuesta que presentan distintos pacientes con tumores del mismo tipo y extensión (Yunis, 1983).

La presencia de una proporción pequeña de células tumorales resistentes en una gran masa puede no influir en la respuesta inicial a la quimioterapia, pero puede explicar porqué pacientes con remisiones completas no siempre están curados. En cambio, la regresión lenta de células tumorales muertas puede crear la

impresión de pérdida de responsabilidad, ya que la repoblación -- por la cepa resistente puede sobrepasar la lisis. La figura (1) - ilustra este problema. Para cada incremento de la muerte celular tumoral indicado por las flechas hay lisis tumoral (línea C) --- y nuevo crecimiento de las células supervivientes residuales (línea B). Dado que la lisis puede ser un proceso lento, la reducción verdadera de la masa tumoral (línea D) puede no reflejar la magnitud de la destrucción tumoral. De hecho, para una muerte celular del 90% la masa tumoral presente en este caso hipotético puede no disminuir por debajo de los límites de palpación.

La célula cancerosa presenta una diana variable y móvil a los fármacos. La interrelación entre la farmacocinética celular es primordial para la quimioterapia anticancerosa en la clínica, - (De Vita, 1990).

2.3.4 PROPIEDADES COMUNES DE LOS QUIMIOTERAPICOS

Casi todos los fármacos anticancerosos comparten dos propiedades comunes: actúan sobre la síntesis de DNA y no afectan las células en reposo, a no ser que dichas células se dividan inmediatamente después de la exposición al fármaco. Los efectos terapéuticos y tóxicos de los agentes quimioterápicos están en relación con el tiempo de exposición de la diana al principio activo a una concentración efectiva. Esta relación se muestra en la figura 2.

Puede alcanzarse el mismo grado de citotoxicidad con diferentes pautas con la misma concentración de fármaco multiplicada por el tiempo de exposición ($C \times T$). Dado que los fármacos son metabolizados y excretados de un modo similar, esta relación se cumple generalmente en todas las especies animales. Este principio ha hecho posible trasladar dosis de fármacos probadas en animales a pruebas clínicas preliminares en el hombre (Skipper, 1964, Schabel, 1978). Para algunos agentes, las dosis expresadas en mg/m^2 - de superficie corporal permiten comparaciones más ajustadas entre las especies. Esto es debido a que la superficie corporal está ---

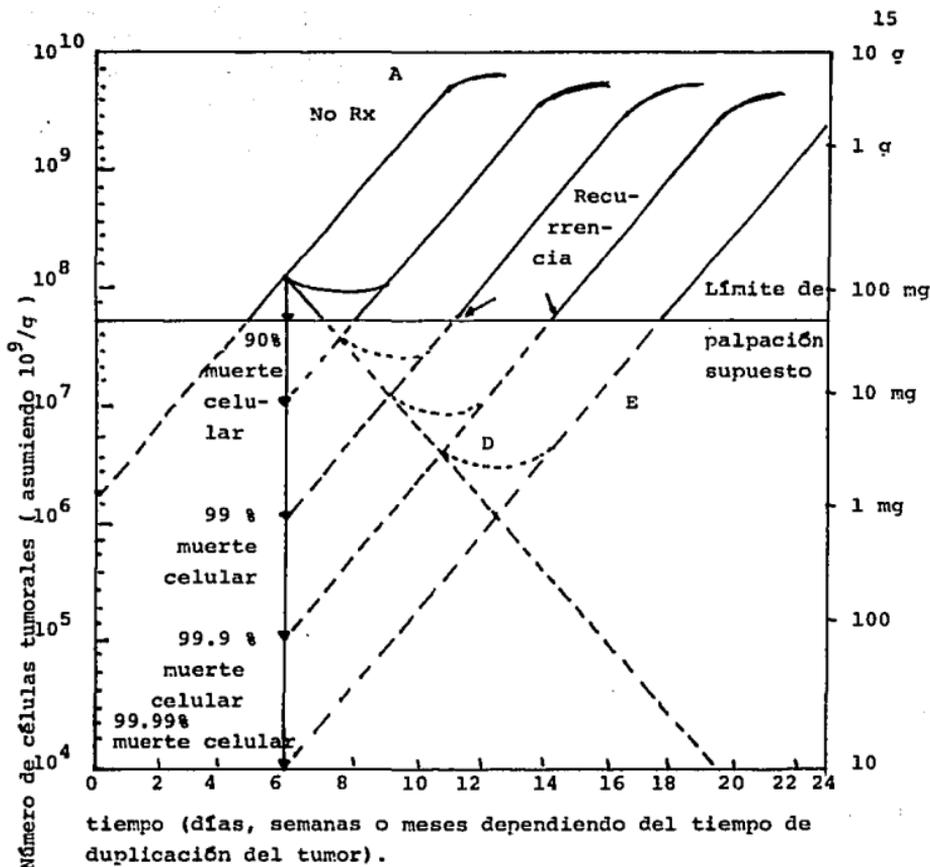


Fig. 1. Descripción hipotética de la relación entre reducción tumoral parcial, nuevo crecimiento del tumor y masa tumoral. La línea A es el tumor sin alteración. La línea B es el índice de nuevo crecimiento de la fracción superviviente. La línea C representa la lisis lenta de células tumorales. La línea D representa el efecto neto de lisis y nuevo crecimiento, - (De Vita, 1990).

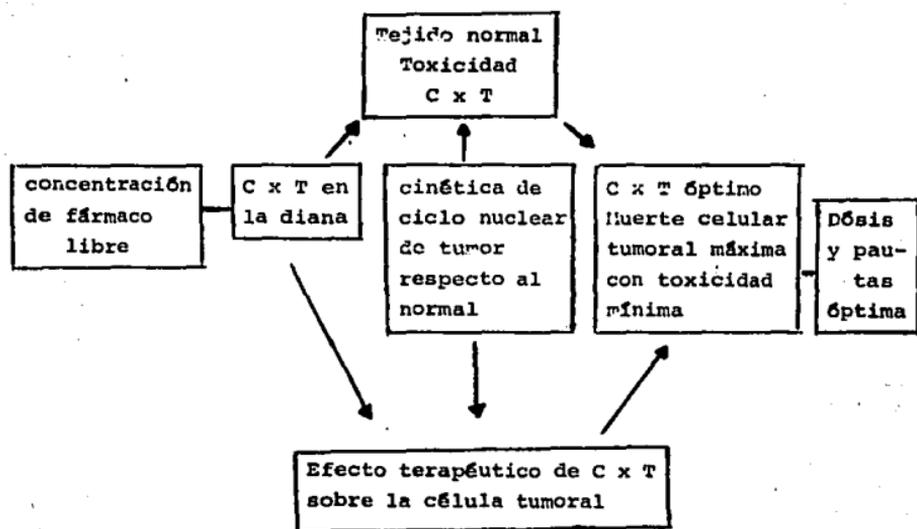


Fig. 2.1 Interacción entre el quimioterápico y la célula.

Concentraciones plasmáticas frente al tiempo de exposición a la célula diana (C x T) (Skipper, - 1980).

muy relacionada con el gasto cardiaco y éste lo está con el flujo sanguíneo hepático y renal (Los principales órganos de excreción y detoxificación). Sin embargo, un valor dado del producto $C \times T$ mostrará un poder citolítico idéntico en todas aquellas poblaciones celulares que posean entre sí similares características de crecimiento y sensibilidad a los fármacos en cuestión, (Breckman, - 1975).

La razón más importante para el fracaso del tratamiento es la resistencia farmacológica. Esta se da en poblaciones celulares porque algunas células son resistentes de novo al agente - - o agentes usados, o bien por el desarrollo de cepas celulares resistentes bajo la presión de la exposición al fármaco (Goldie, - 1979). En el caso de la radioterapia, la situación es muy distinta. La resistencia novo es rara. Está relacionada con la sensibilidad del tejido normal circundante. Con el tratamiento no aparecen cepas resistentes a la radioterapia. Naturalmente, la presencia - y desarrollo de cepas celulares resistentes a los fármacos no son la única razón para el fracaso del tratamiento. La tendencia de - las grandes masas de células tumorales a estar constituidas por células cancerosas no cíclicas y la presencia de nidos inaccesibles a los fármacos desempeñan también papeles importantes. Sin embargo, dado que una sola célula cancerosa viable puede llevar a la muerte del huésped, la aparición de una célula a partir de uno de estos - nidos o la presencia y selección de una cepa mutante resistente son la causa principal del fracaso de la quimioterapia en la clínica - (Skipper, 1978, Goldin, 1956).

El análisis matemático de Goldie y Coldman, que relaciona la sensibilidad al fármaco con el índice de mutación espontánea y la resistencia farmacológica, indica que la probabilidad de que existan clones resistentes aumenta con el tamaño tumoral (Coldman, 1983). La posibilidad de que haya una célula resistente en una población puede variar de menor a mayor probabilidad según la - brevedad del intervalo de crecimiento. Cuanto mayor sea el ritmo de mutación más pronto ocurrirá la citada transición (Skipper, -

1972), mientras que la amplitud de efecto será mayor cuanto más largo sea el tiempo de duplicación (Coldman, 1983). Puede asumirse con seguridad que ya existe resistencia a los quimioterapéuticos convencionales en el momento en que el paciente consulta al médico. Además, es muy probable que la exposición a los citostáticos de lugar a la aparición de líneas celulares con fenotipos quimiorresistentes. (Coldman, 1983).

2.4.1 FARMACOS ANTITUMORALES

Un hecho particularmente interesante es la capacidad de las células tumorales para desarrollar resistencia a los fármacos.

El desarrollo de resistencia de las células tumorales frente a agentes citotóxicos es considerada una de las principales causas de fracaso en la quimioterapia clínica (Carter, 1984).

El problema radica en el hecho de que las células tumorales adquieren resistencia simultánea a muchos de los agentes antineoplásicos comúnmente usados, algunos de los cuales son estructural y funcionalmente diferentes.

El tratamiento del cáncer con fármacos se ha basado en la tesis de que debe ser posible una quimioterapia dirigida contra las células cancerosas en la cual se pueden presentar efectos contra las células normales, pero éstos deben de ser tolerables y reversibles (Muchos compuestos han sido mejorados en cuanto a tal actividad en los últimos cuarenta años).

Las diferencias entre los tejidos normales y los cancerosos pueden ser pequeñas, ya que muchos tejidos normales en ciertos estadios poseen gran capacidad de proliferación que compete y en algunos casos excede a la de los tejidos malignos.

Entre estos tejidos se encuentran elementos de médula ósea; epitelio gastrointestinal y folículos pilosos, que son los que reciben el impacto de los efectos tóxicos de algunos antineoplásicos durante el tratamiento.

Por fortuna, las células normales en proliferación rápida

y las cancerosas no tienen la misma vulnerabilidad y aún puede utilizarse el principio de toxicidad selectiva. Sin embargo se advierte que el margen de seguridad es muy estrecho.

Los fármacos más usados en la quimioterapia contra el cáncer pueden ser clasificados de la siguiente manera:

- a. Antimetabolitos.
- b. Agentes alquilantes.
- c. Antibióticos antitumorales.
- d. Alcaloides tumorales.
- e. Otros agentes antitumorales.

Las dos clases principales de compuestos citotóxicos que han probado ser útiles en el tratamiento contra el cáncer son:

1. Aquellos que interfieren en la síntesis de precursores de DNA.
- 11 Aquellos que interactúan químicamente con el DNA.

2.4.2 ANTIMETABOLITOS

Los antimetabolitos son compuestos que poseen una estructura molecular similar a aquella que presentan los metabolitos normales de la célula con los cuales compiten; así, estos compuestos son aceptados como sustratos análogos que intervienen en reacciones bioquímicas vitales y de este modo interfieren con los procesos celulares (Chabner, 1982).

Estos compuestos fueron introducidos para el tratamiento de crecimientos malignos por Faber y colaboradores, quienes demostraron en 1948 que el análogo del ácido fólico denominado aminopterina era útil en el tratamiento de leucemias agudas (Bevan, 1982).

La aminopterina ha sido reemplazada por la ametopterina o por el metotrexate, este último aunque menos potente, presenta

efectos secundarios mejor conocidos..

Dentro de los antimetabolitos, el compuesto modelo es el metotrexate, el cual es un análogo del ácido fólico que es transportado al interior celular por medio del acarreador membranal encargado de la captación y transporte de los folatos reducidos con actividad fisiológica (Curt, 1984).

El metotrexate ejerce su efecto citotóxico al inhibir a la enzima dihidrofolato reductasa. Esta enzima es la responsable del mantenimiento de la reserva intracelular de folatos en el estado reducido (forma activa), a su vez tetrahidrofolatos funcionan como acarreadores de grupos de un átomo de carbono para la síntesis de nucleótidos de purina y timidilato.

De este modo, a través de la inhibición de la reductasa se produce una acumulación de folatos en estado oxidado (forma inactiva) y con ello cesa la síntesis de DNA.

El metotrexate sufre una transformación en las células cancerosas convirtiéndose en poliglutamato de metotrexate, el cual se une a la dihidrofolato reductasa con igual o mayor afinidad que el metotrexate.

Después de eliminar el fármaco inicial libre (metotrexate), los poliglutamatos son retenidos intracelularmente, por lo que la formación de éstos puede ser un factor determinante para la duración del efecto del fármaco en las células malignas, ya que la muerte celular es proporcional al tiempo de exposición al fármaco, así como a la dosis aplicada.

El grupo de los antimetabolitos está constituido por los siguientes fármacos: Metotrexate, 5-fluorouracilo, citidinarabino-sido, 6-mercaptapurina, arabinofurasiladenina (ARA-A). (Bertino, 1983, Chabner, 1982).

2.4.3 AGENTES ALQUILANTES

Entre los más notables agentes que interactúan con el DNA, se encuentran los fármacos conocidos como agentes alquilan

tes, denominado así por capacidad para formar enlaces covalentes con los ácidos nucleicos. En esta reacción se unen grupos alquilo al DNA, los cuales interfieren con su integridad y función (Chabner, 1982).

La alquilación trae como consecuencia no sólo una lectura incorrecta del código genético durante la síntesis de proteínas, sino también ruptura de cadenas simples de DNA, ya que se dan como consecuencia de los procesos enzimáticos de reparación. ya que durante la reparación, las bases alquiladas son escindidas por endonucleasas que abren específicamente en el sitio de alquilación. La alquilación trae como consecuencia la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y de proteínas (Chabner, 1982).

Los agentes alquilantes presentan una gran actividad frente a las células en rápido crecimiento, posiblemente porque dichas células no disponen del tiempo suficiente para reparar el daño antes de entrar al ciclo de síntesis de DNA.

Aunque los agentes alquilantes muestran un mecanismo de acción común, se presentan grandes diferencias en sus características de reactividad química, liposolubilidad y transporte a través de la membrana, por lo que no es posible observar una resistencia cruzada uniforme entre estos fármacos al ser usados en la quimioterapia.

Dentro de los agentes alquilantes se encuentran los siguientes fármacos: mostaza nitrogenada; ciclofosfamida, melfalan, clorambucil, busulfan, nitrosourea, cis-platino, (Curt, 1984. --- Chabner, 1982).

2.4.4 ANTIBIOTICOS ANTITUMORALES

Este grupo está constituido por sustancias antimicrobianas que poseen actividad antitumoral, las cuales han sido aisladas de algunos microorganismos que existen en la naturaleza de entre los cuales el más importante es el género *Streptomyces*.

El mecanismo de acción propuesto para los antibióticos -

antitumorales es la unión del fármaco al DNA al intercalarse en las bases nitrogenadas, presentándose una mayor alquilación en la guanina.

Al unirse el fármaco al DNA, no puede llevarse a cabo su replicación a partir del lugar en que se halla presente el fármaco afectando a las células tumorales ya que se están multiplicando.

El grupo de los antibióticos antitumorales lo constituye: bleomicina, antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina), mitomicina C, mitramicina, (Chabner, 1988).

2.4.5 ALCALOIDES ANTITUMORALES

Los alcaloides antitumorales son sustancias extraídas de la Vinca rosea, las cuales presentan estructuras estrechamente relacionadas entre sí; sin embargo a pesar de su similitud estructural, su acción clínica y tóxica presenta diferencias significativas.

La actividad citotóxica de los alcaloides de la Vinca se debe a su capacidad para unirse a la tubulina, cuya polimerización forma la proteína microtubular. La proteína microtubular forma el huso, a lo largo del cual los cromosomas migran durante la mitosis.

Al unirse los alcaloides a la tubulina, inhiben el proceso de ensamblaje de los microtubulos con lo que se logra la formación del huso y se inhibe la división celular (Curt, 1984).

Adicionalmente, los microtubulos juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura celular, ya que forman el citoesqueleto el cual confiere a las células su configuración y forma característica (Avers, 1981).

Las epipodofilotoxinas son sustancias extraídas de la misma planta (Vinca rosea), las cuales presentan importancia clínica en el tratamiento de linfomas, carcinomas pulmonares y cáncer testicular. Al igual que la vincristina y vinblastina, se unen a la tubulina e inhiben el ensamblaje de los microtubulos.

El grupo de los alcaloides antitumorales está constituido por los siguientes fármacos: vincristina, vinblastina, vindesina, epipodofilotoxinas VM26 y VP16, (Chabner, 1982).

2.4.6 OTROS AGENTES ANTITUMORALES

Existen otros compuestos que son usados como agentes antitumorales, entre ellos se encuentra la asparaginasa, la cual produce una carencia de asparagina necesaria para la síntesis de proteínas en la leucemia linfocítica aguda. Ello origina la muerte de las células leucémicas. Sin embargo este producto ha revelado ser hepato y neurotóxico.

Así mismo existen otros compuestos que presentan un mecanismo de acción poco conocido, tal es el caso de la procarbacin, la cual lleva a cabo la despolimeración del DNA, siendo un efecto que aún no está plenamente esclarecido.

Además de los compuestos ya mencionados, existen otras terapias a base de otras enzimas y antagonistas de aminoácidos cuyo origen es principalmente bacteriano; entre estas terapias se encuentran las siguientes:

Treonindesaminasa usada en el tratamiento de leucemia murina; azerina y azotomicina (análogos del ácido glutámico) en el tratamiento de carcinoma pulmonar y de mama; ácido N-fosfonacetilaspártico (análogo del ácido aspártico) en el tratamiento de carcinoma de colon y mama, (Chabner, 1982).

C A P I T U L O I I I

RESISTENCIA DE CELULAS CANCEROSAS
ANTE FARMACOS

3.1.1 RETENCION Y ACUMULACION DE FARMACOS EN LA CELULA TUMORAL

La resistencia frente a múltiples fármacos está asociada a una baja acumulación intracelular de los mismos.

Esto se ha encontrado en diferentes líneas celulares de ratón, hamster y humanas, las cuales fueron seleccionadas en base a su resistencia in vitro (Kartner, 1983), o in vivo (Skousgaard, 1978).

Al seleccionar y comparar las líneas celulares con resistencia secuencialmente creciente, se observa que la acumulación del fármaco está relacionada de manera inversa con el grado de resistencia (Inaba, 1979).

En 1985 Fojo y Col. (Fojo, 1985), encontraron que en las células de carcinoma humano (KB), la acumulación de colchicina, vincristina y vinblastina disminuye al incrementarse la resistencia de las células, observándose el mismo efecto, aunque en menor grado al utilizar actinomicina D.

Mientras que Inaba y col. en 1979 (Inaba, 1979), observaron una apreciable disminución en la captación y retención de daunorubicina y adriamicina al usar células leucémicas humanas resistentes (P388/ADR).

A partir de las observaciones anteriores, el estudio de las células resistentes se enfocó en la membrana plasmática, debido a que los cambios observados en la estructura y función de dicha membrana están relacionados con una respuesta alterada frente a los agentes citotóxicos.

Se ha encontrado que la alteración más consistente que se presenta en las células resistentes a múltiples fármacos es la expresión aumentada de una glucoproteína de superficie elevada masa molecular (170 - 180 KDa.) denominada glucoproteína-P (p proviene de permeabilidad).

La presencia de esta glucoproteína fue demostrada inicial

mente en células de hamster resistentes a colchicina, observándose que se expresa en mayor proporción en las células resistentes en comparación con las correspondientes células sensibles (Beck, - 1987).

A partir de los estudios realizados por Víctor Ling en - 1976 (Bradler, 1988), en los cuales se observa que la baja acumulación intracelular en colchicina es una característica de las células resistentes que presenta una expresión aumentada de la glucoproteína-P, se postuló que esta glucoproteína podría estar involucrada en la modulación de las propiedades de la membrana, reduciendo la acumulación del agente citotóxico.

Como se mencionó anteriormente, el grado de expresión de la glucoproteína-P es proporcional al grado de resistencia ya que se observó una baja cantidad de la glucoproteína en las células - sensibles y revertantes (Meyers, 1989).

Otra evidencia de que la glucoproteína-P está involucrada en la resistencia a múltiples fármacos, proviene de experimentos de transfección, en los cuales las características de dicha resistencia (incluyendo la expresión aumentada de glucoproteína-P) pueden ser transferidas a células sensibles mediante la adición de DNA proveniente de células resistentes a múltiples fármacos (Bradley, - 1988).

3.1.2 CAMBIOS A NIVEL DE MEMBRANA

El análisis de un considerable número de células de hamster, ratón y de origen humano resistentes a múltiples fármacos, se demostró que la resistencia se correlaciona de modo directo con la expresión de un antígeno de superficie de 170 KDa., el cual presenta reacción cruzada con la glucoproteína-P (Bradley, 1988).

De este modo, la importancia de la glucoproteína-P en la resistencia a múltiples fármacos puede asumirse de la siguiente manera:

1. La resistencia a múltiples fármacos puede ser transferida mediante la transfección de células sensibles con DNA de ----

células resistentes.

En todas las líneas celulares transfectadas, la adquisición de resistencia está asociada a la expresión aumentada de la glucoproteína-P

II. Las células seleccionadas en base a su resistencia frente a un sólo fármaco, presentan expresión aumentada de una glucoproteína de superficie (170 KDa.), la cual inmunológicamente presenta reacción cruzada con la glucoproteína-P obtenida de células resistentes a múltiples fármacos.

Debido a que la glucoproteína-P se encuentra presente tanto en células de origen humano, de hamster así como de ratón, se sugiere que esta molécula se conserva en cuanto a tamaño y características inmunológicas a través de las especies, lo que lleva a pensar que se trata de un componente importante de las células.

Esto dió origen a la investigación de la presencia de glucoproteína-P en los tejidos humanos normales (no tumorales), observándose lo siguiente:

Al examinar 17 diferentes tejidos, 6 de ellos mostraron un relativo elevado nivel en el contenido de glucoproteína-P. Es - tos tejidos fueron: hígado, páncreas, riñón, colon, yeyuno y glándulas adrenales; sospechándose que en el hígado, riñón e intestino, la glucoproteína puede estar funcionando como un transportador de múltiples compuestos para proteger a la célula animal, ya que es - tos órganos son sitios a los cuales llegan los productos tóxicos - presentes en la dieta y los introducidos al organismo bajo la forma de quimioterápicos, los cuales deben ser removidos (Fojo, 1987, - Gottesman, 1988).

En los tejidos estudiados, la glucoproteína-P se localiza en la superficie celular, siendo esta localización adecuada para su papel de transportador (Bradley, 1988).

En el hígado de la rata, se observa un incremento en la expresión de glucoproteína-P después de un tratamiento a base de - sustancias carcinógenas, apoyando la idea de que la expresión aumen

tada de glucoproteína es una respuesta frente a un desafío con -
agentes tóxicos.

En los casos de pacientes con cáncer de mama en los que se estudió la expresión de la glucoproteína-P, se encontró que -
aquellos que no fueron tratados mediante quimioterapia o los trata-
dos con agentes quimioterapéuticos no asociados a la resistencia
frente a múltiples fármacos (mitoxantrona, prednisona), no se
presenta una expresión apreciable de la glucoproteína-P.

Mientras que en los casos en los que los pacientes fueron
tratados con fármacos asociados a la resistencia frente a múltiples
fármacos (vincristina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo), se aprecia
una clara expresión de dicha molécula.

Así mismo, se ha observado que la expresión de la gluco-
proteína-P está relacionada de manera directa con el grado de rein-
cidencia de los pacientes, ya que se observa una expresión clara de
esta molécula en pacientes con elevada reincidencia (8-12 veces)
(Schneider, 1989).

Esta última observación, también se encuentra en los pa-
cientes con leucemia linfoblástica aguda (Rothenberg, 1989 , Dise-
la, 1991).

La glucoproteína-P ha sido caracterizada bioquímicamente
como una glucoproteína integrante de la membrana plasmática.

Para conocer su estructura, se llevó a cabo el análisis
de la porción peptídica de dicha molécula.

De este modo se encontró que existen 1280 residuos de -
aminoácidos en la molécula de glucoproteína-P obtenida de células
humanas resistentes a múltiples fármacos, calculándose una masa mo-
lecular de 141 KDa. (Stark, 1986).

La molécula completa de glucoproteína-P parece estar -
constituida de segmentos transmembranales repetitivos. Cada segmen-
to presenta un extremo N-terminal que contiene un segmento hidrofó-
bico y un extremo C-terminal que contiene un sitio de unión para
ATP, cuya hidrólisis provee de energía para el transporte de fárma-
cos; así como una fracción glucosídica que se proyecta hacia el - -

exterior celular la cual esta unida a la porción peptídica de la molécula.

Así cada uno de estos segmentos estructurales repetitivos contiene una región hidrofílica la cual probablemente se proyecta hacia el citoplasma y una región hidrofóbica que puede estar embebida en la membrana celular, considerándose que la molécula de glucoproteína va entrando y saliendo del citoplasma a lo largo de la membrana en una forma característica formando una especie de poros en la membrana. (Bradley, 1988).

La orientación de los segmentos transmembranales de la glucoproteína a través de la membrana están en forma tal que la porción C-terminal de la molécula queda hacia el citoplasma, como se había establecido anteriormente mediante anticuerpos monoclonales (Stark, 1986).

Al analizar la secuencia completa de los aminoácidos que integran la porción peptídica de la glucoproteína-P obtenida de células sensibles y resistentes a múltiples fármacos, se observa que dicha secuencia corresponde a la conformación mencionada anteriormente. Esta conformación se presenta en la figura 3.

3.1.3 RELACION ENTRE PROTEINAS BACTERIANAS DE TRANSPORTE Y GLUCOPROTEINA - P

La porción citoplasmática de la glucoproteína-P se asemeja a ciertas proteínas bacterianas de transporte capaces de fijar fármacos (Marx, 1986).

Este es el caso de la gran homología que se presenta entre la secuencia que codifica para la glucoproteína-P y la secuencia que codifica para la proteína hlyB, que es una proteína bacteriana de membrana, presente en las cepas de Escherichia coli, la cual es necesaria para el transporte de la hemolisina α (proteína de 107 kDa., que efectúa la hemólisis).

Se observa una homología máxima en la región que circunda al sitio de unión para ATP (Gerlanck, 1986).

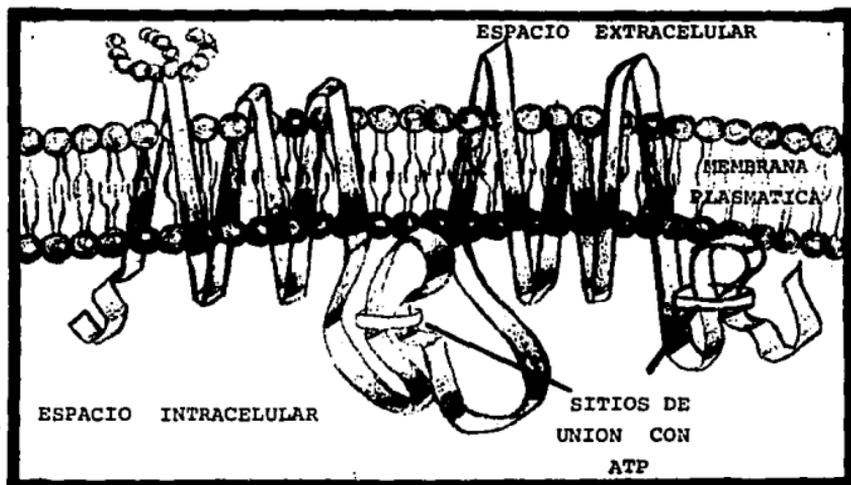


Figura 3. DISEÑO

La mayor parte de la glucoproteína se encuentra alojada en la membrana y en el citoplasma. La porción exterior contiene la fracción glucosídica de la molécula, mientras que los sitios de unión para ATP se encuentran proyectados hacia el citoplasma (círculos).

Marx, L.J. Science 234: 818 - 820, 1986.

Por otra parte, la presencia de sitios de unión para ATP en la molécula de glucoproteína-P se deriva de la homología que se presenta en esta región (sitio para unión de ATP) al compararla con otras proteínas bacterianas de transporte que pueden unir ATP tales como hisP, malk oppD, pstB y rbsA (Chen, 1986, Gros, 1986).

La primera deducción de la presencia de sitios de unión para ATP en la molécula de la glucoproteína proviene del análisis de la secuencia de la molécula misma.

Otro hallazgo sorprendente es el hecho de que el grado de homología entre la glucoproteína-P (proteína de mamíferos) y las proteínas bacterianas de transporte es tal, que puede compararse con la homología que se presenta entre sí en las proteínas bacterianas.

De hecho, la proteína hlyB se asemeja más a la glucoproteína-P que a hisP, malk, oppD y pstB, abriéndose la posibilidad de que la glucoproteína-P esté involucrada en el transporte de fármacos aprovechando la energía proveniente de la hidrólisis de ATP, (Gerlach, 1986).

3.1.4 RELACION DEL TRANSPORTE DE FÁRMACOS CON EL ATP

Para investigar el efecto que ejerce el ATP sobre la modulación de la captación y excreción de los fármacos, se han realizado múltiples experimentos en los cuales se han medido estos procesos en función de la concentración de ATP, al usar un inhibidor metabólico.

Al usar rotenona, se observa que en las células normales, el grado de captación y excreción de los fármacos, se han realizado múltiples experimentos en los cuales se ha medido un inhibidor metabólico.

Al usar rotenona, se observa que en las células normales, el grado de captación de colchicina se incrementa al disminuir la concentración de ATP aproximadamente por debajo de 2.0 -----

nmATP/10⁶ células, mientras que en las células resistentes no se observó estimulación en la captación sino hasta concentración de ATP fue menor de 0.5 nmATP/10⁶ células.

En presencia de 2, 4-dinitrofenol, se observa que la captación de daunorubicina aumenta; si adicionalmente se agrega glucosa, se observa la excreción del fármaco de las células resistentes, alcanzándose una concentración intracelular muy cercana a la observada en ausencia del inhibidor (observándose un efecto similar con adriamicina), sugiriendo que la adición de glucosa disminuye la captación de los fármacos, probablemente debido a la producción de energía necesaria para el funcionamiento del mecanismo que remueve al fármaco (Inaba, 1979), de lo que se deriva que los cambios en el nivel de captación del fármaco están mediados a través de los cambios en la concentración del ATP celular.

Los cambios en la concentración de ATP pueden estar involucrados junto con un posible cambio conformacional de la glucoproteína-P en el mantenimiento de la baja acumulación intracelular de los fármacos en las células resistentes a múltiples fármacos.

Así mismo se ha observado que los anestésicos locales entre los que se encuentran la lidocaina logran una mayor acumulación intracelular de colchicina en las células resistentes, debido a que interactúan con los lípidos de la membrana, alterando su permeabilidad.

Este hecho apoya la tesis que considera que la alteración en la permeabilidad de la membrana es de vital importancia para reducir la acumulación intracelular del fármaco (Bradley, 1988. - Rothenber, 1989).

3.1.5 DISEÑOS EMPLEADOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LA GLUCO - PROTEINA - P

En base a los datos experimentales acerca del transporte de fármacos y de la información obtenida de la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína-P de células de ratón, hamster y humanas resistentes a múltiples fármacos se han propuesto dos modelos para el funcionamiento de esta molécula:

En el primer modelo se propone que la glucoproteína-P forma un canal en la membrana plasmática a través del cual los fármacos son transportados hacia el exterior de la célula usando energía proveniente de la hidrólisis del ATP.

A pesar de la información disponible en cuanto a la glucoproteína, se desconoce el número de moléculas necesarias para formar un canal.

En el modelo propuesto anteriormente, la glucoproteína se une directamente a los fármacos y después los remueve de la célula, en este punto existen dos consideraciones que hay que tomar en cuenta:

- a). La unión entre la glucoproteína-P y el fármaco debe ser reversible, ya que las moléculas de fármaco tienen que ser liberadas en la superficie celular.
- b). Debido a que en las células resistentes a múltiples fármacos se presenta resistencia cruzada a fármacos no relacionados estructuralmente, la molécula glucoproteína-P debe tener sitios de unión diferentes para los diversos grupos de fármacos hacia los que se presenta esta resistencia cruzada.

Apoyando el modelo anterior, existen evidencias experimentales que apoyan la función de la glucoproteína-P como un captador de fármacos, entre las que se encuentran las siguientes:

1. En las células humanas y de hamster resistentes a múltiples fármacos, se presentan vesículas membranales que muestran expresión aumentada de una proteína de 150-180 KDa., la cual presenta sitios para la unión de vinblastina, (Cornwell, 1986). La identidad entre la proteína de 150 180 KDa., capaz de unir vinblastina y la glucoproteína-P fue probada por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína, encontrándose que se trata de la misma molécula.
11. En los experimentos realizados por Pastan y col. en 1986 (Beck, 1987), quienes estudiaron la unión de (^3H) vinblastina a las vesículas de células resistentes a múltiples fármacos es mayor que la observada en las células sensibles.

En las vesículas mencionadas anteriormente se observa competencia en la captación de vinblastina al estar presente otro fármaco tal como la vincristina y en menor grado por la presencia de daunorubicina, por lo que existe la posibilidad de que estos fármacos puedan estar compitiendo por el mismo sitio de unión---o por sitios de unión adyacentes. Sin embargo al probar con cisplatino, colchicina y actinomicina D, no se observa competencia por los sitios de unión de la vinblastina a las vesículas membranales de las células resistentes a múltiples fármacos, apoyándose de esta manera la posible existencia de sitios de unión para los diferentes fármacos hacia los que se presenta la resistencia (cornwell, 1985., Scaloni, 1991).

En un segundo modelo propuesto para el funcionamiento de la glucoproteína-P, una proteína que une al fármaco es transportada hacia el exterior celular por medio del mecanismo de transporte de esta glucoproteína, en un proceso análogo al observado en la exportación de la hemolisina α por la proteína hlyB en E.

coli. La proteína hipotética (proteína de unión, diferente a la glucoproteína-P) puede ser un constituyente normal de la célula, sin embargo debe ser producida en cantidades suficientes ya que es removida de manera continua.

En este modelo, el fármaco puede unirse irreversiblemente a esta proteína y posteriormente el complejo fármaco-proteína de unión es transportado hacia el exterior celular.

Debido a que el transporte del complejo fármaco-proteína de unión requiere de energía, se estudió este aspecto, encontrándose que la glucoproteína-P presenta cierta actividad de ATP-asa, existiendo la posibilidad de que la hidrólisis del ATP realizada por la glucoproteína-P esté acoplada al transporte del fármaco (Bradley, 1988).

Este modelo concuerda con los estudios realizados con alcaloides de la vinca y antraciclina, en los cuales se detectó la presencia de un mecanismo de transporte de fármacos dependiente de ATP (Beck, 1983).

Para correlacionar los aspectos bioquímicos y los morfológicos encontrados en las células resistentes a múltiples fármacos se cuenta con el estudio de la ultraestructura de la membrana plasmática realizado por Arsenault y col. en 1988 (Arsenault, - 1988), en el cual se observa una gran densidad de partículas intramembranales (IMP) en el extremo protoplasmático de la membrana de células resistentes.

El contenido de partículas intramembranales se correlaciona con el contenido de glucoproteína-P y con el grado de resistencia que se presenta en las células resistentes de hamster y células leucémicas humanas.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la expresión aumentada de glucoproteína-P conduce hacia cambios globales en la estructura de la membrana plasmática. (Trowbridge, Disela, 1991).

3.1.6 DISTINTAS PROPIEDADES CELULARES RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS

Se han encontrado una serie de cambios bioquímicos útiles para distinguir a las células resistentes a múltiples fármacos de las células sensibles (presencia de una proteína de 19-22 KDa., elevada actividad de glutatión transferasa, glutatión peroxidasa fosfatasa alcalina y proteínasa A), los cuales no están debidamente documentados como lo está la presencia de la glucoproteína-P.

Algunos de ellos han sido estudiados a la par en células revertantes, encontrándose que se correlacionan con el grado de resistencia.

Entre estos cambios se encuentra la presencia de una pequeña proteína citoplasmática de aproximadamente 19-22 KDa., denominada sorcina/V-19 ó p21 (Stoclet, 1981), inicialmente identificada en células resistentes a vincristina.

Mediante la preparación de antisuero contra la sorcina, se facilitó su detección en células resistentes a otros fármacos y mediante inmunoaglutinación se determinó que la sorcina se ha conservado a través de la evolución.

La sorcina se encuentra presente en una gran variedad de células de ratón, hamster y humanas resistentes a vincristina, actinomicina D, colchicina y adriamicina y es una de las proteínas que capta mayor cantidad de calcio.

En las células resistentes a múltiples fármacos existe correspondencia entre la expresión aumentada de la glucoproteína-P y la expresión aumentada de sorcina, y mediante estudios de genética molecular (Bradley, 1988), se encontró que el gene de la sorcina se encuentra próximo al gene de la glucoproteína-P en las células resistentes de hamster y humanas, y al parecer la expresión aumentada del gene de la sorcina es el resultado de su coamplificación debido a su localización contigua al gene de la glucoproteína-P.

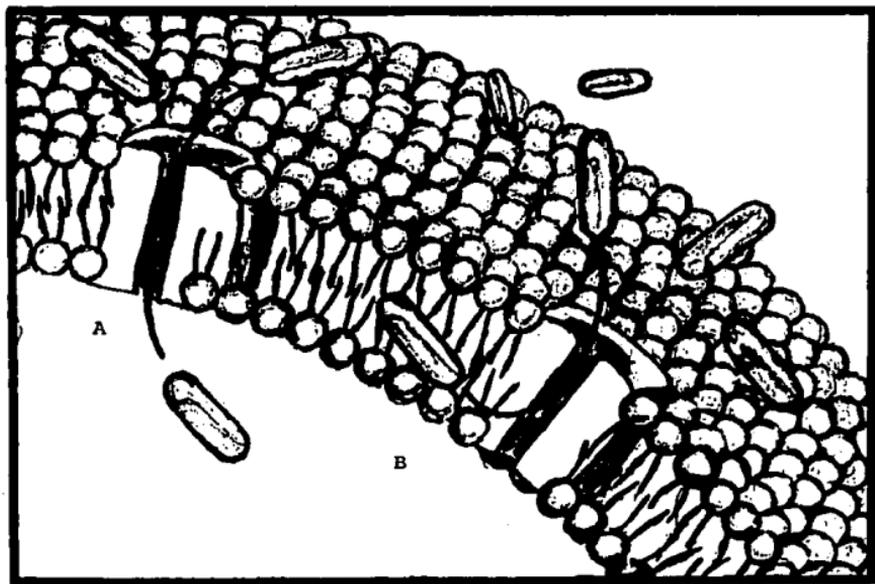


Figura 2.

En A la glucoproteína-P exporta directamente a dos fármacos estructuralmente diferentes.
En B los fármacos, se unen a una proteína (diferente a glucoproteína-P), la cual es posteriormente exportada hacia el exterior por la glucoproteína-P. Gerlach, H.J. y col., *Nature*, 324: 485 - 489 , - 1986.

Sin embargo, la amplificación y expresión aumentada del gene de la sorcina no se lleva a cabo de manera continua, lo que sugiere que la producción aumentada de esta protefina (sorcina) no es necesaria para el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos.

También se han descrito cambios en la actividad de algunas enzimas entre las que se encuentra la glutatión transferasa - y glutatión peroxidasa, fosfatasa alcalina (Bradley, 1988) y protefincinasa A (Mellado, 1987).

Glutatión transferasa - Glutatión peroxidasa.

La enzima glutatión peroxidasa tiene la función de protección en la célula, ya que junto con el glutatión se encarga de reducir peróxidos, mientras que la glutatión transferasa cataliza la conjugación del glutatión con los radicales libres generados por fármacos (antraciclinas) y radiaciones que contribuyen a la muerte celular por daños al DNA y otros constituyentes esenciales.

De este modo, varios fármacos entre los que se encuentran las antraciclinas son inactivados al ser conjugados enzimáticamente con el azufre de la cisteína que se encuentra en la molécula del glutatión.

Así mismo se ha observado que al poner en contacto a las células resistentes frente a butioninsulfoximida (BSO) (inhibidor selectivo de la síntesis de glutatión) se observa un agotamiento parcial de glutatión, asociándose con un aumento en la susceptibilidad a adriamicina (Kramer, 1988).

Por otro lado, se ha observado que la glutatión transferasa (cuya actividad se encuentra elevada en las células resistentes a múltiples fármacos) también presenta cierta actividad de peroxidasa, siendo su actividad proporcional al grado de resistencia de las células.

De este modo se ha propuesto que el aumento en el nivel de actividad de la glutatión transferasa y de glutatión peroxidasa-

constituyen parte del mecanismo de resistencia contra adriamicina y posiblemente contra otros fármacos involucrados en la resistencia frente a múltiples fármacos.

Proteíncinasa asociada a la resistencia frente a múltiples fármacos.

Si se asume que el ATP puede causar alteraciones en la función de la membrana, un mecanismo posible es la fosforilación de componentes específicos de la membrana.

Para probar la existencia de un posible sistema de fosforilación asociado a la membrana de células resistentes, se aislaron membranas de células de ovario de hamster resistentes a colchicina, demostrándose la capacidad de utilizar ^{32}P ATP para fosforilar proteínas endógenas de membrana, así como aceptores exógenos de fósforo tales como caseína y protamina (Carlsen, 1977).

Posteriormente se encontró que la fosforilación de las proteínas de la membrana de células resistentes es debida a la proteíncinasa A (Mellado, 1987).

Para investigar cuales de las proteínas de la membrana son las que se fosforilan, se analizaron preparaciones de membrana mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, encontrándose que se presenta una mayor fosforilación en proteínas con peso molecular entre 165 - 200 KDa.

Con base al peso molecular de las proteínas fosforiladas, se apoya la hipótesis de que la glucoproteína-P se encuentra dentro de los componentes fosforilados por la cinasa asociada a la membrana.

Aún cuando no se conocen los efectos de la fosforilación en la función de la glucoproteína-P, se sugiere que éstos pueden estar involucrados en la reducida acumulación de los fármacos observados en las células resistentes a múltiples fármacos.

Proteínfosfatasa asociada a la resistencia frente a múltiples fármacos.

Debido a la fosforilación de componentes de la membrana, puede estar involucrada en la acumulación de fármacos en las células resistentes a múltiples fármacos, debe existir la capacidad de llevar a cabo una fosforilación - desfosforilación en la membrana de dichas células.

Por lo tanto, se ha investigado la posible existencia de desfosforilación asociado a la resistencia a múltiples fármacos, - encontrándose que en células de ratón resistentes a vincristina - y adriamicina se presenta una mayor actividad de la fosfatasa alcalina en comparación con las células sensibles (Bradley, 1988).

Estas son algunas de las enzimas cuyo funcionamiento está estrechamente relacionado con la resistencia a múltiples fármacos.

También se han descrito ciertos cambios físicos y biológicos.

El cambio biológico mejor conocido es el de reversión de la transformación, fenómeno observado en células resistentes de hamster y ratón, en el cual estas células presentan una tumorigenicidad disminuida al ser transplantadas.

Mientras que el cambio físico atribuido a las células resistentes a múltiples fármacos es un aumento en la susceptibilidad a la ruptura mecánica, (Roison, 1986, Wilson, 1989).

3.1.7 RELACION DE BAJA RESISTENCIA MEDIANTE AGENTES ESPECIFICOS

Se ha encontrado un grupo de agentes con los que se logra aumentar la concentración intracelular de los agentes antineoplásicos en las células resistentes a múltiples fármacos. Mediante el uso de estos agentes se ha logrado disminuir el grado de resistencia en dichas células. (Basu, 1991, Scanlon, 1991).

La mayoría de estos agentes muestran algunas de las características de los compuestos transportados por la glucoproteína-P incluyendo propiedades lipofílicas y débil basicidad (Gosland, 1989, Sharma, 1992).

A continuación se presenta la clasificación de estos agentes:

- a.) Análogos de antraciclinas y alcaloides de la vinca.
- b.) Bloqueadores de los canales de calcio e inhibidores de la calmodulina.
- c.) Otros agentes.

Análogos de antraciclina y alcaloides de la vinca.

Se ha observado que el efecto citotóxico de la daunorubicina, adriamicina, vinblastina y vincristina se potencia en las células resistentes al administrar simultáneamente sus análogos estructurales.

Estos análogos no tienen efectos citotóxicos por sí mismos, sin embargo, mejoran la citotoxicidad del fármaco al inhibir su excreción, con lo que se logra una mayor acumulación intracelular del mismo.

Esta observación lleva a pensar que el mecanismo de excreción podría contener sitios de unión al menos para dos grupos de fármacos, a saber, antraciclinas y alcaloides de la vinca; que son los que han sido probados.

Estos compuestos incluyen a N-acetildaunorubicina y vinodolina.

Dentro de los agentes recientemente encontrados que se sabe son capaces de disminuir la resistencia a múltiples fármacos asociada a la glucoproteína-P, se encuentra la campotecina y los glucocorticoides, (Mihich, 1989, Basu, 1991).

Bloqueadores de los canales de calcio e inhibidores de la calmodulina.

Los bloqueadores de los canales de calcio son un grupo de compuestos que inhiben la entrada del calcio hacia la célula y con ello el efecto del calcio en las funciones de la misma y de -

un modo específico en la resistencia a múltiples fármacos, debido a que el calcio es requerido para la formación del complejo Ca^{2+} Calmodulina necesario para la activación de muchos sistemas enzimáticos dependientes de calcio tales, ATPasa y proteincinasas.

Entre los bloqueadores de los canales de calcio se mencionan los compuestos siguientes: Verapamil, trifluoperacina y diltiazem.

El análisis de la información muestra que el verapamil es un agente usado con frecuencia en la disminución de la resistencia a múltiples fármacos, observándose que logra antagonizar los efectos de dicha resistencia causada por los alcaloides de la vinca (Cass, 1989).

La concentración de verapamil de 10 μ g/ml., es óptima para aumentar la sensibilidad de las células resistentes a múltiples fármacos, ya que es la concentración para la captación óptima de varios fármacos entre los que se encuentran vincristina, adriamicina y daunorubicina, (Fojo, 1985).

También se ha reportado que a una concentración de verapamil de 1 - 2 μ mol., puede disminuirse la resistencia de Plasmodium falciparum a la cloroquina.

La resistencia presentada por P. falciparum se debe a la excreción de la cloroquina, lo que trae como consecuencia una baja acumulación intracelular de la misma (Wilson, 1989).

Al parecer el verapamil antagoniza con ello la concentración del fármaco en el interior celular, de una manera similar a la disminución de la resistencia a múltiples fármacos en las células de mamífero.

El incremento en la acumulación y retención del fármaco por medio del verapamil, sugiere que este agente (verapamil) compete con los fármacos por los sitios de unión a la glucoproteína, debido a que al estar presente el verapamil, se inhibe la unión de vinblastina a la membrana plasmática de las células resistentes a múltiples fármacos, que es donde también se localiza la glucoproteína-P.

De este modo, se logra incrementar la concentración intracelular del fármaco y con ello se observa una mayor citotoxicidad (Cass, 1989).

Este hallazgo está apoyado por experimentos en los cuales se observa que las células resistentes a múltiples fármacos acumulan y retienen una mayor cantidad de verapamil en comparación con las células sensibles (Willingham, 1986).

También se observa que los inhibidores de la calmodulina tales como trifluoperacina pueden incrementar la acumulación y retención de vincristina, adriamicina y humanas, resultando esto en una reversión de la resistencia (Tsuruo, 1982).

A medida que han avanzado los estudios metabólicos con células cancerosas, se sospecha que el mecanismo de acción de algunos agentes que incrementan acumulación intracelular de los agentes citotóxicos también involucra alteraciones en el estado de fosforilación de la glucoproteína-P, lo que podría ayudar a la evasión de la resistencia de la célula tumoral.

Apoyando la idea anterior, se ha encontrado que los cambios de fosforilación en las proteínas celulares están asociadas con la resistencia a vincristina y adriamicina en células humanas (carcinoma de mama).

Se han reportado los primeros casos de pacientes con mieloma múltiple en los cuales se ha disminuido la resistencia frente a vincristina, doxorubicina y dexametasona mediante la administración oral de verapamil.

Esto ha beneficiado a los pacientes con mieloma, al administrar junto con vincristina, doxorubicina y dexametasona.

Sin embargo el verapamil presenta cierta citotoxicidad cuyas principales manifestaciones son hipotensión moderada y arritmia cardíaca pasajera; afortunadamente estas manifestaciones son toleradas por los pacientes con mieloma en etapa avanzada (Dalton, - 1989).

Otros agentes.

Además de los compuestos mencionados anteriormente, se han encontrado otros agentes moduladores del transporte a nivel membranal que revierten la resistencia a múltiples fármacos e incluyen: quinidina, tomoxifen, isoprenoides sintéticos, propanolol (Bradley, 1988), cloroquina (Zamora, 1986), y ciclosporina A (Silberman, 1989).

Estos agentes fueron estudiados en diferentes líneas celulares, encontrándose que todos ellos logran disminuir la resistencia a un gran número de agentes citotóxicos (vinblastina, vincristina, daunorubicina, adriamicina, colchicina y actinomicina D), usados en la quimioterapia contra el cáncer.

Muchos de estos agentes que logran disminuir la resistencia a múltiples fármacos son de naturaleza anfipática.

En la investigación de moduladores más seguros y efectivos, se encontró que la eritromicina es otro agente que logra disminuir significativamente la resistencia a múltiples fármacos.

Este antibiótico lleva a cabo su acción al saturar los sitios de unión que se forman entre los fármacos (actinomicina D, doxorubicina) y la glucoproteína-P, con lo que se reduce la capacidad de esta glucoproteína para transportar estos fármacos hacia el exterior celular.

Se observa que a una concentración de eritromicina 250 µg/ml se presenta un incremento en la acumulación intracelular de actinomicina D y doxorubicina en células murinas resistentes (Hofslí, 1989).

Las cefalosporinas son otro grupo de antibióticos efectivos en la disminución de la resistencia, muchos de los cuales presentan características similares a las de los compuestos transportados por la glucoproteína-P.

Dentro de este grupo, la cefoperazona es la que presenta una mayor efectividad en la modulación de la resistencia a múltiples fármacos, además de presentar una menor toxicidad para el organismo al compararla con el verapamil y con la trifluoperacina.

ya que estos últimos presentan toxicidad severa a una concentración plasmática inferior a la necesaria para disminuir dicha resistencia, (Gosland, 1989).

También se ha observado un incremento en la acumulación intracelular de daunorubicina al adicionar ciclosporina A en una concentración de 3 μ mol en las células provenientes de pacientes con leucemia mielocítica aguda que presentan una expresión aumentada de glucoproteína-P.

De este modo, la ciclosporina A es un agente que puede resultar adecuado para ser combinado con la doxorubicina y daunorubicina que son los medicamentos utilizados en el tratamiento de la leucemia mielocítica aguda (Nooter, 1990).

A partir del hallazgo de los agentes que logran disminuir la resistencia a un gran número de agentes citotóxicos, se ha estimulado la formación de protocolos de tratamiento en los que pueden ser combinados estos agentes junto con el fármaco citotóxico adecuado para de este modo disminuir la resistencia frente a múltiples fármacos.

C A P I T U L O I V

ASPECTOS GENETICOS DE CELULAS TUMORALES ANTE LA RESISTENCIA A MULTIPLES FARMACOS

4.1.1 HALLAZGO DE GENES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A MULTIPLES FARMACOS

El estudio de los medios por los cuales las células tumorales desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos ha revelado gran cantidad de información acerca de los mecanismos de captación, metabolismo y excreción de fármacos, así como la comprensión de procesos celulares tales como la amplificación y regulación de la expresión de la expresión genética, (Mincione, 1993, Perry, 1992). La complejidad de la resistencia a múltiples fármacos sugiere que para que se presente, se requieren de múltiples eventos genéticos. Sin embargo, los estudios realizados en células resistentes de hamster han demostrado que la alteración en un sólo gene o en un pequeño número de ellos, puede dar origen a la resistencia frente a un fármaco, resistencia cruzada frente a fármacos estructuralmente diferentes y expresión aumentada de la glucoproteína-P en la membrana, (Cummins, 1993, Mugele, 1993). Las observaciones de que el aumento en la expresión de la glucoproteína-P es el cambio bioquímico que se presenta con mayor frecuencia en las células multirresistentes (Bradley, 1988) y de que la alteración en un sólo gene o un pequeño número de ellos puede dar origen a la resistencia frente a múltiples fármacos, sugiere que una alteración en el gene que codifica para la glucoproteína-P puede ser la causa de tal resistencia. Con base en las consideraciones anteriores, una aproximación directa al problema de la resistencia es el estudio del gene que codifica para la glucoproteína-P, (Efterth, 1992).

De este modo algunos investigadores han clonado genes que comúnmente son amplificados y sobreexpresados en diversas líneas celulares resistentes a múltiples fármacos (Gros, 1986), encontrándose que estos genes codifican para la glucoproteína-P (Vander, 1986) --- (Shen, 1986).

Al aislar el cDNA que codifica para la glucoproteína-P, se obtuvo un fragmento de 660 pares de bases (pCHP1) (Kartner, 1983), existiendo evidencias que demuestran que el fragmento de cDNA obtenido representa una fracción de uno de los genes que codifican para la glucoproteína-P, (Cummings, 1993).

1. El fragmento pCHP1 aislado codifica para un polipéptido que es reconocido por tres anticuerpos monoclonales de los cuales identifican a diferentes regiones de la molécula de glucoproteína-P.
Esto demuestra que el polipéptido codificado por el fragmento pCHP1 forma parte de la glucoproteína-P, (Bradley, 1988).
11. En las células resistentes de hamster (CHO) se detectó un Rn Am de 4.7 kilobases, observándose correspondencia entre el contenido de este RNAm, el grado de resistencia y el contenido del fragmento pCHP1 (Bradley, 1988).
111. Se aisló cDNA de células resistentes (análogo al fragmento pCHP1) cuyo análisis de secuenciación reveló una estructura proteica similar a la fracción peptídica de la glucoproteína-P que se encuentra integrada a la membrana, (Gerlanck, 1986).

De este modo se sugiere que el fragmento pCHP1 codifica para una porción de la glucoproteína-P.

Por otro lado se aisló cDNA de genes que presentan una expresión aumentada en células resistentes, bajo el supuesto de que estos genes deberían ser algunos de los que controlan la resistencia a múltiples fármacos (Vander, 1988); en un experimento posterior se encontraron seis fragmentos de cDNA de diferentes tamaños (Gerlanck, 1986), observándose que secuencias similares a las de -

los seis fragmentos amplificadas en las células resistentes a múltiples fármacos (CH^R C5) de hamster; por lo que se sospecha que al menos seis genes son amplificados y expresados en forma aumentada en las células resistentes a múltiples fármacos. De los fragmentos de cDNA aislados, es denominado como clase 2, presenta hibridación cruzada con el cDNA del fragmento pCHP1 de la glucoproteína-P y el análisis posterior de la secuencia del fragmento de clase 2 confirmó que éste codifica para una porción de la glucoproteína-P (Bradley, 1988), y que es el único expresado en forma aumentada de manera constante (De Bruijin, 1986).

4.1.2 AMPLIFICACION GENETICA EN LAS CELULAS RESISTENTES A MULTIPLES FARMACOS

En las células humanas KB resistentes a múltiples fármacos se han encontrado amplificadas dos secuencias de DNA denominadas *mdr1* y *mdr2*, observándose que la correspondiente a *mdr1* fue amplificada en algunas de ellas (Roninson, 1988).

Estos hallazgos sugieren que los genes denominados *mdr1* y *mdr2* (debido a que contienen las secuencias *mdr1* y *mdr2*) pudieran ser dos miembros diferentes de una familia de genes.

Dos grupos de investigadores dirigidos Chen y Ueda (Chen, 1986, Ueda, 1986), encontraron que la secuencia *mdr1* es un transcrito completo del gene *mdr1*, presentándose una gran homología entre esta secuencia que codifica para la glucoproteína-P en el hamster (Bradley, 1986).

Las evidencias de que estas secuencias codifican para la glucoproteína-P provienen de los siguientes hechos:

- a.) La fuente inicial de DNA son células conocidas que presentan elevada resistencia a múltiples fármacos y que se sabe expresan en forma aumentada glucoproteína-P.

Entre las células usadas se encuentran CH^RC5, KB, - DC-3F/VCR-d-5L, LZ.

- b.) La transfección de células sensibles de hamster con DNA de ratón (similar al del gene *mdr*), produjo una expresión aumentada de glucoproteína-P en las células receptoras.

Diversos estudios se han demostrado que la transfección de las células sensibles con DNA proveniente de células resistentes a múltiples fármacos, da como resultado la expresión de dicha resistencia en las células receptoras (Debenham, 1982. Sugimoto, 1987).

Mediante el uso de oncoproteínas virales dirigidos contra la glucoproteína-P fue posible demostrar que la transferencia de resistencia, mediada por DNA, está asociada a la expresión aumentada de la glucoproteína-P, (Watanabe, 1993).

En 1987, Deuchars y col. (Deuchars, 1987), efectuaron un estudio en el que las células de ratón (LTA) sensibles fueron transfectadas con DNA proveniente de células resistentes de hamster (CH^RC5), encontrándose que en todas las células transfectadas se detectaron secuencias que codifican para la glucoproteína-P de hamster, mientras que con anterioridad no presentaban amplificación de secuencias para la glucoproteína de la misma especie (ratón).

A partir de que todas las células transfectadas muestran una expresión aumentada de glucoproteína, se sugiere que las secuencias para esta proteína fueron transfectadas y expresadas en la célula receptora. Esto apoya la hipótesis de que para que se presente la resistencia a múltiples fármacos es necesaria la expresión de la glucoproteína-P (Shen, 1986).

Es evidente que todos los estudios realizados para aislar los genes están asociados con la resistencia a múltiples fármacos, dirigen hacia el gene de la glucoproteína-P, corroborándose que se

trata de una molécula conservada a través de las especies y que su expresión aumentada es la alteración bioquímica más frecuentemente encontrada en las células resistentes a múltiples fármacos.

Mediante estudios citogenéticos se ha encontrado que en las células de hamster, la resistencia a múltiples fármacos está asociada a la amplificación genética manifestada citológicamente mediante la presencia de regiones cromosómicas teñidas homogéneamente (HSR) y de cromosomas dobles pequeños (d mins), estos últimos (cromosomas dobles) aparecen como pequeñas estructuras esféricas en pares.

Presumiblemente las condiciones de cultivo seleccionan a las células tumorales para presentar cromosomas dobles o regiones cromosómicas teñidas homogéneamente ya que los trabajos realizados en células resistentes han demostrado que en ausencia del fármaco, los cromosomas dobles se pierden, mientras que las regiones cromosómicas teñidas homogéneamente son retenidas en las células (Stark, 1984).

Debido a que durante el crecimiento del tejido tumoral en ausencia del fármaco los cromosomas dobles pequeños frecuentemente desaparecen, con la aparición de regiones teñidas homogéneamente, se sugiere que las dos manifestaciones citológicas pueden ser formas alternas de la expresión de la amplificación genética.

No obstante que los cromosomas dobles y las regiones teñidas homogéneamente son detectados predominantemente en células cancerosas que presentan resistencia, en algunas ocasiones también se presentan en células cancerosas antes de iniciar la quimioterapia (Biedler, 1981).

Sin embargo la presencia o ausencia de anomalías citológicas debe tomarse con reserva ya que muchas células resistentes que se sabe ahora presentan secuencias amplificadas para la glucoproteína-P, no presentan regiones teñidas homogéneamente o cromosomas dobles identificables, probablemente debido a que la longitud total de las secuencias amplificadas no es suficiente para producir una anomalía citológica observable.

Tabla I

EVIDENCIAS CITOLOGICAS DE LA AMPLIFICACION GENETICA EN LAS
CELULAS RESISTENTES A MULTIPLES FARMACOS

Línea celular/Fármaco	Evidencia citológica de la <u>amplificación</u> genética	Comentario
Células de ovario de hamster: Colchicina: CH ^R B30	d mins, HSR	Amplificación de secuencias de la glucoproteína-P.
Colchicina: CH ^R C5	HSR	Amplificación de genes de la <u>glucoproteína-P</u>
Células de pulmón de hamster (DC-3F): Vincristina: VCRD	HSR	Longitud de HSR proporcional al grado de <u>resistencia</u> .
Adriamicina	d mins	Número de d mins proporcional al grado de <u>resistencia</u> .
Línea celular MAZ de <u>tu</u> mor murino: Vincristina	d mins	Número de d mins proporcional al grado de <u>resistencia</u> , <u>amplificación</u> de genes de la glucoproteína-P

Tabla II

EVIDENCIAS CITOLÓGICAS DE LA AMPLIFICACION GENETICA EN LAS
CELULAS RESISTENTES A MULTIPLES FARMACOS (Continuación)

Línea celular/Fármaco	Evidencia citológica de la amplificación genética	Comentario
Línea celular SEWA de tumor murino:		
Actinomicina D	d mins, HSR	
Colchicina	d mins	
Vincristina	d mins	
Actinomicina D	d mins	Pérdida de d mins en células revertantes
Carcinoma humano (KB):		
Colchicina	d mins	d mins ausentes en células revertantes
Adriamicina	d mins	
Vinblastina	d mins	
Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)		
Vincristina	d mins	Amplificación de genes de la glucoproteína-P
Cáncer de mama humano (MCF_7)		
Adriamicina	HS	Amplificación de genes de la glucoproteína-P

H SR: Regiones cromosómicas teñidas homocéneamente d mins: Cromosomas dobles recueños.

4.1.3 DETERMINACION DE TRANSCRITOS CORRESPONDIENTES A LA GLUCOPROTEINA-P

En todas las líneas celulares examinadas a la fecha, el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos está asociada a un elevado contenido de RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P, cuyo tamaño estimado es de 4,5-5 kilobases, observándose también aunque en forma minoritaria la presencia de otros transcritos de 2-2.3 y de 10.5 kilobases (Ueda, 1986).

El elevado nivel de RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P se traduce en un incremento en la cantidad de esta proteína en las células resistentes seleccionadas con concentraciones crecientes de diferentes fármacos con el nivel de RNAm de la glucoproteína-P y con el contenido de esta glucoproteína en membrana plasmática.

En 1987, Fojo y col. (Fojo, 1987), realizaron un estudio para determinar la transcripción del RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P en diferentes tejidos humanos tumorales, encontrando que existe una marcada diferencia en la transcripción de la molécula entre ellos (hígado, pulmón, recto, colon y glándulas adrenales).

De este modo, los tejidos humanos tumorales con elevado contenido de RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína fueron: riñón y glándulas adrenales.

Se encontró un menor contenido en pulmón, hígado, colon y recto; y un estudio posterior (Bradley, 1988) de el contenido de glucoproteína-P en tejidos humanos normales, reveló que se presenta un menor contenido de esta molécula en los tejidos normales en comparación con los tejidos tumorales, observándose además una localización específica de la glucoproteína (superficie celular).

En las células sensibles se ha detectado un nivel de RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P muy reducido (Vander, 1986). Para detectarlo se ha aislado y estudiado el cDNA que corres

ponde a los transcritos de glucoproteína-P de células sensibles sugiriendo un hallazgo importante: la glucoproteína-P es codificada por una familia de genes *mdr*.

En tres estudios independientes, en los cuales se usaron diferentes células de hamster, ratón humano, se encontró que al menos dos miembros de la familia de genes (genes *mdr1* y *mdr2*) son expresados en cada caso.

Posteriormente al analizar el DNA de células resistentes - de hamster, ratón y humano usando el fragmento pCHP1 (fragmento de cDNA que codifica para la fracción peptídica de la glucoproteína-P) se encontraron múltiples fragmentos de DNA, que coinciden con la existencia de una familia de genes para dicha fracción peptídica, la mayoría de los cuales contienen segmentos reconocidos por el fragmento pCHP1.

Al hacer la selección de células resistentes de hamster - (CHO) mediante el uso de colchicina en los pasos de selección, se observa una amplificación progresiva de segmentos homólogos al fragmento pCHP1; la amplificación simultánea de estos segmentos en las células resistentes de hamster indica que los miembros de la familia de genes de la fracción peptídica de la glucoproteína-P probablemente se encuentran localizados de manera contigua.

Así mismo se observa que en las células de hamster ($CH^R C5$ - y $CH^R B30$) que presentan una elevada resistencia, se amplificaron en diferente grado dos series de segmentos homólogos al fragmento - - pCHP1, por lo que los miembros de la familia de genes que codifican para la fracción peptídica de la glucoproteína-P podrían ser amplificados diferencialmente durante el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos.

De un modo similar, el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos en las células humanas (CEM-VLB) y de ratón (ECH^R) - está asociado con la amplificación de una serie de segmentos de DNA reconocidos por el fragmento pCHP1 (Biedler, 1981).

En los estudios realizados por De Bruijn y col. en 1986 --- (Deuchars, 1987), se presenta un mismo patrón amplificación diferen-

cial de segmentos de DNA entre células obtenidas en forma independiente, por lo que es probable que los segmentos que son amplificados en diferente grado, correspondan a diferentes miembros de la familia de genes de la fracción peptídica de la glucoproteína-P.

Sin embargo, el patrón de amplificación no puede predecirse en base al fármaco usado, ya que al aislar en forma independiente células DC-3F de hamster, usando vincristina como fármaco de selección, se observan diferentes patrones de amplificación de las secuencias de la proteína; mientras que en otro grupo de células DC-3F seleccionadas con tres fármacos diferentes, se observa el mismo patrón de amplificación en todas ellas (Biedler, 1981).

Una posible explicación a esta falta de correspondencia sería que el patrón de amplificación de DNA detectado por un sólo fragmento (pCHP1), ofrece una representación incompleta de la amplificación de los genes que codifican para la fracción peptídica de la glucoproteína-P en las células resistentes a múltiples fármacos.

C A P I T U L O V

CONCLUSIONES

El desarrollo de resistencia a muchos de los agentes quimioterapéuticos utilizados en los tratamientos antineoplásicos, es uno de los principales problemas que se encuentra asociado al tratamiento de enfermedades neoplásicas en el hombre.

Al observar este fenómeno en el campo clínico se encuentra que al aplicar un fármaco por primera vez a un paciente con cáncer, resulta adecuado; pero los subsecuentes tratamientos son progresivamente menos fructíferos debido a la aparición de células resistentes.

Estas células presentan resistencia no sólo al fármaco utilizado en el tratamiento inicial, sino a una gran variedad de fármacos, los cuales presentan diferencias tanto en su estructura como en su mecanismo de acción.

Se ha observado que las células resistentes a múltiples fármacos, presentan diversos cambios, entre los que se encuentran la alteración en la actividad de algunas enzimas y presencia de proteínas de diferentes masas moleculares; sin embargo la alteración que se presenta con mayor frecuencia en dichas células, es la expresión aumentada de una glucoproteína de superficie elevada masa molecular denominada glucoproteína-P. Se sugiere que esta glucoproteína está asociada a la baja acumulación intracelular de los fármacos observada en las células resistentes a múltiples agentes antineoplásicos, por lo que se ha hecho énfasis en el estudio de esta molécula.

Con base en la información analizada, se plantean dos posibles modelos para el funcionamiento de la glucoproteína-P:

1. La glucoproteína-P forma un canal en la membrana plasmática a través del cual los fármacos son transportados hacia el exterior de la célula.

2. Una proteína (diferente a la glucoproteína-P) que se une al fármaco es transportada hacia el exterior celular por medio de la glucoproteína-P que funciona como bomba de excreción.

Ambos modelos representan un concepto simplificado de -- una serie de fenómenos que ocurren tanto en el interior como en la superficie celular, pudiendo no ser excluyentes uno del otro, por el contrario, podrían tener aspectos complementarios, ya que uno de ellos por sí solo, no puede explicar todos los fenómenos asociados a la resistencia a múltiples fármacos.

Con base a lo anterior, puede hacerse un nuevo planteamiento en el cual se retomem los aspectos más relevantes de cada modelo para de este modo lograr una mayor comprensión de la resistencia a múltiples fármacos.

Dentro de las preguntas que permanecen aún sin ser resueltas y a las que en el futuro se tendrá que prestar mayor atención, está el hecho de probar si la glucoproteína-P es parte de un sistema que utiliza la célula para la "desintoxicación" celular, y si así fuera, investigar los factores metabólicos que lo llevan hacia una forma alterada como es la que se presenta en las células tumorales.

A partir de la observación de que una glucoproteína de su superficie está involucrada en la resistencia a múltiples fármacos, se abre la posibilidad de estudiar de qué manera podría inhibirse la síntesis de tal proteína o bien bloquearse, y si al lograrlo, se consiguiera que la célula tumoral resistente se convirtiera en sensible.

Otro aspecto de relevancia es el descubrimiento de los agentes que logran disminuir la resistencia, tales como los bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la calmodulina y los análogos de antraciclinas y alcaloides de la vinca.

Sin embargo, la eficacia de estos agentes es aún cuestionable debido a la toxicidad que algunos de ellos presentan para el organismo.

Es importante hacer énfasis en la necesidad de nuevos productos que puedan ser más eficientes. Además, para tener una mayor información sobre el problema de la resistencia a múltiples fármacos en la célula tumoral, son necesarios estudios de regulación metabóli

ca y de los mecanismos de acción de los fármacos en la misma.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Ames, L., Ferro, G. The basis of multidrug resistance in mammalian cells: Homology with bacterial transporters. *Cell*, 47:323, - 324, 1985.
2. Arsenault, A.L., Ling, V., Kartner, N. Altered plasma membrane - ultra structure multidrug-resistant cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 938:315-321, 1988.
3. S. Avers, J.Ch. *Biología celular*, segunda ed Interamericana pp. 498-506, México, 1981.
4. Bagshawe, L.K. Reversed-role chemotherapy for resistant cancer. *The Lancet*, 4:778-781, 1986.
5. Bar Sagi, D., Ferámisco, R.J. Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induced morphological differentiation. *Cell*, 42:841-848, 1985.
6. Basu, A. Lazo, J.S. Suppression of dexametasone, induced metallothionein expression and cis-diaminedichloroplatinum (II) resistance by V-Mus. *Cancer Res* 51 (3) :893-6, 1991.
7. Bech-Hansen, N.T., Till, J.E., Ling, V. Pleiotropic phenotype of colchicine resistance CHO cells: Cross resistance and collateral sensitivity. *J. Cell, Physion.*, 88:23-32, 1976.
8. Beck, T.W. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem, Pharmacol.*, 36:2879-287, 1987.
9. Beck, T.W. Cirtain, C.M., L.J. Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblast. *Mol. Pharmacol.*, 24:485-492, 1983.

10. Bertino, R.J., D.M., WEiner, L.H., Cashmore, A., Moroson, A.B., Srimatkandada, S., Schornagel, H.J. Medina, D.W., Drude, K.S. Gene amplification and altered enzymes as mechanisms for development of drug resistance. *Cancer treat. Rep.* 67:901-904, 1983.
11. Bevan, A.J. *Fundamentos de farmacología, segunda edición* ed. Harla Harper & Row Latinoamericana pp. 694-705, México, 1982.
12. Biedler, J.L., Peterson, R.H.F. *Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents*, pp. 453-482, Academic - press N.Y. 1981.
13. Bradley, G., Juranka, F.P., Ling, V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 948:87-128, 1988.
14. Bramwell ME, Bhavanandan VP, Wiserman G et al: Structure and function of the Ca antigen Br. J. Cáncer 48:177-183, 1983.
15. Brockman R.W. Circumventions of resistance: Pharmacologic basis of cancer chemotherapy 27 th Manual Symposium on Fundamental Research, pp. 691-711. University of Texas M.D. Anderson Hospital and tumor Institute Baltimore. Williams & Wikins, - 1975.
16. Burns, C.P., Lutienegger, G.D., Dudley, T.D., Buettner, R.J., Spector, A.A. Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and mathtrate transporte in - LL210 murine leukemia cells. *Cancer Res.*, 39:1726-2732, 1979.
17. Campisi, J, Fingert H.J., Pardee AB: Basic biology and bio - chemistry of cancer in Knapp RC, Berkowitz RS (eds): *Gynecologic, Oncology*, Chapter 2, New York, Macmillan, 1984.

18. Carlsen, A.S.Till, E.J.,Ling,V. Modulation of drug permeability in chinese hamster ovary cells:Possible role for phosphorylation of surface glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 467:238, 250, 1977.
19. Carter, K.S. Some Thoughts. on resistance to cancer chemotherapy. *Cancer Trest. Rev.*, 11:3-7, Suppl.A, 1984.
20. Cass.E.C., Wierczorek,J.A.,Linch, A.M., Hinderburg, A., Beck, T.W. Sheinin,H. Effect of duration of exposure to-verapamil on vincristine activity against multidring-resistant leukemic cells lines. *Cancer Res.*,49:5798-5804, 1989.
21. Coldman al, Goldie J.H.: A model for the resistance of tumor cells to cancer Chemotherapeutic agents. *Mathematical Bioscience*. 65:291-307, 1983.
22. Cornwell, M.M. Gottesman,M.M. Hastan, H.I. Increased vinblastine binding to membrana vesicles from multidrug-resistant KB cells. *J. Biol Chem.* 261:7921-7928, 1986.
23. Cornwell,M.H.,Safa,R.A.,Felsted,L.R.Cottesman,M.M. Pastan I, Membrane vesicles from multidrug; resistant human cancer,cells contain a specific 150-170 KDa protein detected by photoaffinity labeling. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*,833847-3850, 1985.
24. Cowan,H.K.,Batist,G.,Tulpule,A.Sinha,K.B.Myer,E.C. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.*, 83:9328 - 9332, 1986.

25. Croop, M.J. "Guild, C.B., Gros, P., Housman, E.D. Genetics of multidrug resistance: Relation ship of cloned gene to the complete multidrug resistant phenotype. *Cancer Res.*, 47: 5982-5988, 1987.
26. Croop, M.J. Perspectives in cancer research, *Cancer Res.*, 44: 3643 - 3653, 1984.
27. Cummings, L. Warren, CE. Antisense and sense cDNA expression cloning using autonomously replicating vectors and toxic. Lectin, selection, *Biochem Biophys Res Commun* 195(2): 814-22, 1993.
28. Curt, A.G., Cleindennin, A.B. Drug resistance in cancer. *Treat. Rep.* 68: 87-99, 1994.
29. Chabner, A.B., Gottesman, M.M., William, G.F. Foundation think tank on multidrug resistance in cancer chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 391-394, 1988.
30. Chabner, A.B., Myers, E.C. Clinical Pharmacology of cancer chemotherapy. In de Vita Jr., T.V. *Cancer principles & practice of oncology*. Ed. J.B. Lippincot CO. USA pp. 156-197, 1982.
31. Chen, J.C. Chin, E.J., Ueda, K., Clark, P.D., Gottesman, M.M., Roninson, B.I. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (p-glycoprotein) gene from multidrug, resistant human cells. *cell.*, 47:381-389, 1986.
32. Dalton, S.W., Grogan, M.T., Meltzer, S.P., Scheper, J.R., Durie, M.G.B., Taylor, W.C., Miller, P.T., Salmon, E.S. Drug resistance in multiple myeloma and non-Hodkin's lymphoma: detection of p-Glycoprotein therapy. *J. Clin. Oncol.*, 7:415-424, 1989.

33. Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. *Cancer in molecular biology* Scientific, American Books inc New York, pp. 1035-1080, - 1986.
34. De Vita VT., Henney J.E. Hubbard SM: Estimation of the numerical and economic impact of chemotherapy in the treatment of cancer in Burchenal Jlt, Oeugen Hs(eds): *Cancer Achievements, Challenges and Prospects for the 1980 s*. pp. 857-880. New York, Grune & Stratton 1981.
35. De Vita Vicent T. Jr. *Cáncer principios y práctica de Oncología*, segunda ed. Salvat pp. 3;56, 242-244, México, 1990.
36. Debenham, G.P., Kartner, N., Siminovitch, L., Riordan, R.J., Ling, V. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrana glycoprotein expression. *Mol. Cell. Biol.*, 2:881 - 889. 1982.
37. De Bruijn, M.H.L., Vander Blik, A.M., Biedler, J.L. Borst, P. Differential amplification and disproportionate expression of five genes in three multidrug-resistant chinese hamster lung cell lines. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 4717-4722, 1986.
38. Deuchars, K.L., Du, R.P., Everden, P., Kartner, D., Vander Blik, A.M. - Ling, V. Expression of hamster p-glycoprotein and multidrug resistance in mouse LTA cells. *Mol. Cell. Biol.*, 7:718-724, 1987.
39. Disela, C. Glineur, C. V-erba over expression is required to extinguish c-erba function in erythroid cell differentiation and regulation of the erba target gene *CALL*. *Genes Dev.* 5(II):20 - 33-47, 1991.

40. Downward, J., Yarde, Y., Mayes, E., Scacc, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., Waterfield, D.M. Close similarity of epidermal Growth factor receptor and v-erb-B Oncogene protein sequences. *Nature*, 307:521-527, 1984.
41. Everson, T.C. and Cole W.l.t. Spontaneous Regression of cancer Philadelphia. W.B. Saunders Co. 1966.
42. Fialkow PJ: Clonal origin and stem cell evolution of human tumors in Mulvihill JJ, Miller RW, Fraumeni JF, JR. (eds): *Genetics of human Cancer*, pp. 439 - 452. New York, Raven Press, 1977.
43. Fojo, T.A., Ueda, K., Slamon, I.D., Poplack, G.D., Gottesman, M.M. Pastan, I. Expression of multidrug - resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl. Ac.D.Sci. USA.*, 84: 265-269, ---- 1987.
44. Fojo, T.A., Akiyama, I.C., Gottesman, M.M., Pastan, I. Reduced drug-accumulation in multiply drug -resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 45: 3002-3007, 1985.
45. Furuya, Y. Sato, N. Appearance of malignant phenotype with partial loss of hormone dependency in androgen dependent Shionogi Carcinoma 115 transfected with hst-1 gene., *pn. J. Cancer Res. 82(II): 1245-51.*, 1991.
46. Gerlach, H.J., Endicott, A.J., Juranka, F.P., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, L.K., Ling, V. Homology between p-Glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest - a model for multidrug resistance. *Nature*, 324:485-489., 1986.

47. Gishizky, M.L. Witte, ON. Initiation of regulated growth of multipotent progenitor cells by bcr-abl in vitro, *Science.*, 256-(5058): 836-9, 1992.
48. Goldie J H., Coldman A J: A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to the spontaneous mutation rate, *Cancer treat Rep* 63: 1727 - 1733. 1979.
49. Goldie, H.J., Coldman, J.A. The genetic origin of drug resistance in neoplasma: Implication for systemic therapy. *Cancer Res.*, -- 44: 3643-3653, 1984.
50. Goldie, H.J., Coldman, J.A. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Res.*, 49: - 6901 - 6905, 1989.
51. Goldin A. Venditt, J.M. Humphries SR et al: Influences of the concentration of leukemic inoculum on the effectiveness of treatment *Science* 123:840, 1956.
52. Gosland, P.M., Lum, L.B., Sikic, I.B., Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Res.*, 49: 6901, - 6905, 1989.
53. Gottesman, M.M., Pastan, I. The multidrug transporter, a double-edged sword, *J. Biol. Chem.*, 263: 12163-12166, 1988.
54. Greenstein, P.J. *Biochemistry of cancer.* Academic Press Inc. Pub. New York pp. 327-365., 1954.
55. Gros, P., Croop, J. Housman, D. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47: 371-380, 1986.

56. Hamada, H., Hagiwara, K.I., Tsuruo, T. Phosphorilation of the M 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: Effects of verapamil, trifluoperazine and photbol esters. *Cancer res.* 47: 2860-2865, 1987.
57. Haskell, M.C. *Cancer Treatment* second edition W.B. Saunders Co. pp. 21-42, 1985.
58. Hofsl, E., Meyer, N.J. Reversal of drug resistance by erythromycin: Erythromycin increases the accumulation of actinomycin D, and doxorubicin in multidrug-resistant cells. *Int. Cancer.* 44: 149-154, 1989.
59. Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y., Johnson, K.R. Active -- Efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of p388 leukemia., *Cancer Res.*, 39:2200-2203, -1979.
60. Jacalyn, H.P. Oncogenes Growth factors and hematopoietic cell-transformation. *Biochim. Biophys.* 989: 189, 1989.
61. Janis, A.R. Scriabine., A. Sites of action Ca^{2+} + channel inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 32:2499-2507, 1983.
62. Johnsson, A., Heldin, Ch., Wasteson, A., Wastermark, KB. Deul, T.F., Huang, J.S., Seeburg, P.H., Gray, A. The C^{-} sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3:921-928, 1984.
63. Kao, C. Hauser, P. Simian Virus 40 (SV40) Fantigen mutations -- in tumorigenic transformation of SV40 - immortalized human uro-epithelial cells. *J-Virol.* 67(4), 1987-95, 1993.

64. Kartner, N., Shales, M., Riordan, J.R. Ling, V. Daunorubicin - resistant chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 43: 4413 - 4419, 1983.
65. Kato, H. y Schull W.J: Studies of the mortality of A-bomb survivors, Mortality, 1950-1978, Part 1, *Cancer Mortality Radiat. Res.*, 90, 395-432, 1982.
66. Koleta, G. Why do cancer cells resist drugs *Science*, 231 -220, 221, 1986.
67. Kramer, A.R., Zahane, J., Kim, G. Role of the glutathione re - dox cycle in aquire and the novo multidrug resistance., *Science*. 241: 694 - 696, 1988.
68. Larsen, L.F., Vincenzi, F.F. G. Calcium transport across the plasma membrane: Stimulation by calmodulin, *Science*, 204: 306-308, 1979.
69. Marshall Ek Jr. Historical, perspectives in Chemoterapy, Vol 1, pp. 1-8 New York Academic Press 1964.
70. Marx, L.J. Drug resistance of cancer cells probed. *Science*, -- 234: 818-820, 1986.
71. Mellado, W., Horwitz, B.S. Phosphorilation of the multidrug resistance associated glycoprotein. *Biochemistry*, 26:6900-6904, - 1987.
72. Mihich, E. First annual Pezcoller symposium: Drug resistance - Mechanism and reversal. *Cancer Res.*, 49: 7168-7171, 1989.

73. Mincione, G., Cirafici, A.M. Loss of thyrotropin regulation and transforming growth factor beta-induced growth arrest in erb B-2 over expressing rat throid cells. *Cancer Res.* 15:53 (22): 5548 - 53., 1993.
74. Meyers, B.M., Rittman, L., O' Brien, P.J., R.A. Characterization of monoclonal antibodies recognizing a 180,000 P-glyco - protein. *Cancer Res.*, 49: 3209 - 3214, 1989.
75. Meyers, B.M., Schneider, A.K., Spengler, A.B., Chang, D.T., - Biedler L.J. Sorcin (V19), a soluble acidic calcium-binding protein over produced in multidrug-resistant cells. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2373-2380, 1987.
76. Mugele, K. Kugler, H. Inmortalizaci6n of a fetal rat brain cell fine that expresses corticotropim-releasinf factor mRNA , DNA -cell- *Biol.* 12(2): 119-26, 1993.
77. Muller, R. Proto-oncogenes and differentiation. *TIBS*, 11 March, pp. 129-132, 1986.
78. Muller, R., Curran, T., Muller, D., Guilbert, I. Induction of c-fos during myelicytic differentiation and microphage prolife - ration, *Nature*, 314:546-548, 1985.
79. Muller, R., Verma, I.M. Expression of cellular oncogenes. *Curr-Top. Microbiol. Immunol.*, 112: 73-115, 1984.
80. Niederle, N. Kloke, O. Long - term treatment of chonic myeloge - nous Leukemia with different interferons: results from thre -- studies. *Leuk-Lymphoma* 9(1-2): III - 9, 1993.
81. Nooter, K., Sonneveld, P., Oostrum, R., Herweijer, Magenbeck, - t., Valerio, D Overespression of the mdrl gene in blast cells-

- from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be reversed by cyclosporin-A. *Int. J. Cancer*, 45: 263-268, 1990.
82. Ono, M. Nakayama, Y. Polyoma middle tantigen or V-src desensitizes human epidermal growth factor receptor function and interference by a monensin-resistant mutation in mouse Balb/313 cells. *Exp-Cell. Res* 203(2): 456-65, 1992.
83. Perry, ME. Commans, M. Simian virus 40 large tumor antigen alone or two cooperating oncogenes convert Ref52 cells to a state permissive for gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 89 (17): 8112 - 6, 1992.
84. Ramu, A., Glaubiger, D., Joshi, A. Plasma membrane lipid structural order in doxorubicin-sensitive and-resistant P388 cells *Cancer Res.*, 43: 5533-5537, 1983.
85. Robbins Stanley L. *Patología estructural y funcional*, segunda ed. Interamericana 133-174, 178-199, México, 1985.
86. Roninson, B.L., Chin, E.J. Choi, K., Housman, E.D., Fojo, T., Shen, W.D., Gottesman, M.M., Pastan, I. Isolation of human mdr Dna sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells *Proc., Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 4538 - 4542, 1986.
87. Rothenberg, L.M., Mickley, A.L., Cole, E.D., Balis, M.F., Tsuruo T., Poplack, G.D., Fojo, T.A. Expression of mdr-1/P 170 Gene in patients acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, 74:1388-1395, 1989.
88. Sharma-SV. Melittin resistance: a counterselection for rastransformation, *Oncogene* 7(2):193-201, 1992.

89. Sachs, L. Growth, differentiation and the reversal of malignancy. *Sci. Am.*, 254: 30-37, 1986.
90. Scaloni, K.J. Kashani, Sabet M. Cisplatin resistance in human cancers. *Pharmacol ther* 52(3): 385-406, 1991.
91. Schabel F.M. Jr. Simpson-Herren L. variables in experimental tumor system which complicate interpretation of data from in vivo kinetic and pharmacologic studies with anticancer drugs. *Antibiot Chemother* 23: 113-127. 1978.
92. Schneider, M.B., Efferth, Th., Kaufman, M. Mattern, J. and Volm, H. p-Glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 60: 815-818, 1989.
93. Schurr, E. Raymond, N., Bell, C.J., Ghos, P. Characterization of the multidrug resistance protein expressed in cell clones stably transfected with the mouse *mdr1* cDNA. *Cancer Res.*, 49: 2729-2734, 1989.
94. Scotto, W.K., Biedler, L.J., Melers, W.P. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells, *Science*, 232: 751-755, 1986.
95. Sehested, M., Skovsgaard, T., Roed, H. The carboxylic ionophore monensin inhibits active drug efflux and modulates in vitro resistance in daunorubicin Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol.*, 37: 3305-3310, 1988.
96. Shen, W.D., Pastan, I., Gottesman, M.M. In situ hybridization analysis of acquisition and loss of the human multidrug resistance gene. *Cancer Res.*, 48: 4334-4339, 1988.

97. Shen, W.D., Fojo, A., Chin, E.J., Roninson, B.I., Richert, N., Pastan, I., Gottesman, M.M. Human multidrug-resistant cell lines: Increased mdrl expression can precede amplification, *Science*, 232: 643-645, 1986.
98. Siefried, M.J., Burkes, G.T., Tritton, Cellular Transport of - anthracyclines by passive diffusion. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 593-598, 1986.
99. Silberman, H.M., Boersma, M.W., Janssen, W.L.A. Scheper, J.L., Herweijer, H., Nooter, K. Effects of cyclosporin A and verapamil on the intracellular daunorubicin accumulation in chinese hamster ovary cells with increasing levels of drug-resistance. *Int. J. Cancer*, 44:726, 1989.
100. Simpson Herren L. Sanford AH, Holmquist JP: cell population-kinetics of transplanted Lewis lung carcinoma, *Cell tissue - Kinet* 7:349-361, 1974.
101. Skipper HE, Hutchison D.J. Schabel F, M. Jr. et al: A quick reference chart on cross-resistance between anticancer agents *Cancer treat. Rep.* 56: 493-498, 1972.
102. Skipper HE: *In the proliferation and Sread of Neoplastic Cells* pp. 213;233, Baltimore Williams & Wilkins, 1968.
103. Skipper HE: Reasons for success and tailure in treatment of murine leukemias with the drugs now employed in treating human leukemias. *Cancer Chemotherapy*, Vol. pp. 1-166 Ann Ar - bor, MI. University Microfilms International, 1978.
104. Skipper HE. Shabel F.M. Jr. Mellet L.B. et al: Implications of biochemical, citokinetic, pharmacologic, and Toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother Pep.* 54: 431-450. 1950.

105. Skipper et E. Schabel F.M. Jr. Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents. XII. On the criteria and Kinetics associated with "curability" of experimental Leucemia Cancer Chemother Pep. 35: 1-111. 1964.
106. Skovsgaard, T. Carrier-mediated transport of daunorubicin, adriamycin and rubidazone in Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. Pharmacol., 27: 1221-1227, 1978.
107. Stark, R.G. Progress in understanding multidrug resistance. Nature, 324: 407-408, 1986.
108. Stark, R.G. Gene amplification. Ann. Rev. Biochem., 53:447-491, 1984.
109. Stites, P.D., Stobo, D.J., Funderberg, H.M. Wells, V.J. Inmunología básica y clínica, Quinta edición, editorial El Manual Moderno, pp. 226-244, 1985.
110. Stoclet, C.J. Calmodulin: An ubiquitous protein which regulates calcium-dependent cellular functions and calcium movements. Biochem. Pharmacol., 30:1723-1729, 1981.
111. Sugimoto, Y., Tsuruo, T. DNA-mediated transfer and cloning of a human multidrug-resistant myelogenous leukemia K562. Cancer Res., 47: 2620-2625, 1987.
112. Tannock, IF: Biology of tumor growth, Hosp. Pract. 81-93, 1983.
113. Trowbridge, PW., Frisque, RJ. Analysis of G418 selected Rat-2 cells containing prototype, variant, and chimeric JC, virus and SV40 genomes Virology. 1 96(2): 458-74, 1993.

114. Tsai, CM. Chang, KT. Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung, cancer cell lines, with Her 2/nev-gene expression but non with ras gene mutations. J Nat l. - Cancer inst. 85(II):897-901, 1993.
115. Tsuruo, T. Kawabata, H., Nagumo, H., Kitatani, Y., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. Potentiation of antitumor agents by calcium - channel blockers with special reference to across-resistance - patterns Cancer Chemoth. Pharmacol., 15:16-19, 1985.
116. Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. Increased - accumulation of vincristine and adriamycin in drug resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Res., 42: 4730-4733, 1982.
117. Ueda, K., Cornwell, M.M. Gottesman, M.M. Pastan, I., Roninson, B.I., Ling, V. Riordan, R.J. The *mdr1* gene, responsible for multi - drug resistance codes for p-glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Comm., 141: 956-962, 1986.
118. Van der Bliek, M.A., Van der Velde-Koerts, T., Ling, V., Borst, P. Overexpression and amplification of five genes in a multidrug re - sistant chinese hamster ovary cell line. Mol. Cell. Biol. 6: - 1671-1678, 1986.
119. Varmus, E.H. The molecular genetics of cellular oncogenes, Ann Rev. Genet., 18:553-612, 1984.
120. Vassilev, M.P., Kanazirska, P.M., Charamella, J.L., Dimitrov, V.N. Tien, H. Changes in calcium activity in membranes from *cis*-Diamine-dichloroplatinium (II)-resistant and - sensitive, L12-10 cells. Cancer Res., 47:519-522, 1987.

121. Vitkauskas, V.G., Canellakis, S.E. Intracellular communication and cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 823:19-34, - 1985.
122. Vrignaud, P., Montaudon, D., Galiardi, L.D., Robert, J. Fatty acid composition and metabolism in doxorubicin sensitive and -resistant rat glioblastoma cells. *Cancer, Res.* 46: 3258-3261, 1986.
123. Watanabe, K.Y., Growth dependence of human papilloma virus 16-DNA- positive cervical cancer cell lines and human papilloma, virus 16-Transformed human and rat cells, on the viral oncoproteins. *Jon- J- Cancer Res.*, 84(10):1043-9, 1993.
124. Wilson, H.C., Serrano, E.A. Wasley, A., Bogenschutz, P., Shankar, H.A. With, F.D. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*, *Science*, - 244:1184-1186, 1989.
125. Willingham, C.M., Cornwell, M.M. Cardarely, O.C., Cottesman, M.M., Pastan, I. Single cell analysis of daunomycin up take and efflux in multidrug-resistant and- sensitive KB cells: - Effects of verapamil and others drugs, *Cancer Res.*, 46: 5941 - 5946, 1986.
126. Yanovich, S., Taub, N.R. Differences in daunomycin retention in sensitive and resistant P388 leukemic cells as determined by digitized video fluorescence microscopy. *Cancer Res.*, 43: - 4167-4171, 1983.
127. Yunis J. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221 (4607): 227-236, 1983.

128. Zamora, M.J., Beck, T.W. Chloroquine enhancement of anticancer drug cytotoxicity in multiple drug resistant human leukemic cells. *Biochem., Pharmacol.*, 35: 4303-4310. 1986.