

19
201

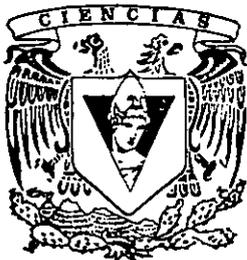


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACION CITOPLASMATICA DE
TOPOISOMERASA II ALFA EN UNA LINEA
CELULAR HUMANA DE CANCER DE PULMON.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VICTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO



Director
en I.B.B. RAUL BARRERA RODRIGUEZ.
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR
1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26 8810



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"LOCALIZACION CITOPLASMATICA DE TOPOISOMERASA II ALFA EN UNA
LINEA CELULAR HUMANA DE CANCER DE PULMON"
realizado por Victor Manuel Bautista de Lucio
con número de cuenta 9021572-0 , pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en I.B.B. Raul Barrera Rodriguez

Propietario

Dra. Claudia González Espinosa

Propietario

M. en C. Victor Manuel Valdés López

Suplente

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Suplente

M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

FACULTAD DE CIENCIAS
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
I.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE PULMON.....	2
I.2 RESISTENCIA QUIMICA A FARMACOS.....	4
I.2.1 GLICOPROTEINA-P.....	6
I.2.2 RESISTENCIA MULTIPLE A FARMACOS MEDIADA POR MRP.....	7
I.2.3 TRANSFERASAS DE GLUTATION.....	9
II RESISTENCIA MEDIADA POR TOPOISOMERASA II.....	11
II.1 CICLO CATALITICO DE LA TOPOISOMERASA II (TOPOII).....	13
II.2 ESTRUCTURA Y REGULACION DEL GEN DE TOPO II alfa.....	16
II.2.1 TOPOISOMERASA II BETA (TOPO II BETA).....	16
II.2.2 REGULACION DE LA EXPRESION GENICA Y ACTIVIDAD CATALITICA DE TOPO II.....	17
II.2.3 LOCALIZACION CELULAR DE LA TOPOISOMERASA II.....	19
II.2.4 TOPOISOMERASA II COMO BLANCO PARA FARMACOS.....	19
II.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A FARMACOS CONTRA TOPO II.....	21
II.3.1 NIVELES REDUCIDOS DE TOPOISOMERASA II.....	21
II.3.2 MUTACIONES PUNTUALES ASOCIADAS CON LA ACTIVIDAD ALTERADA DE TOPOISOMERASA II.....	22
II.3.3 LOCALIZACION SUBCELULAR ALTERADA DE TOPOISOMERASA II.....	23
ANTECEDENTES.....	25

OBJETIVO.....	27
HIPOTESIS.....	27
MATERIAL Y METODOS.....	28
RESULTADOS.....	36
DISCUSION.....	48
CONCLUSION.....	57
REFERENCIAS.....	58
TABLA DE ABREVIATURAS.....	68
APENDICE.....	69

A mis padres: Gonzalo y Esperanza

Que durante todo este tiempo han sido mi gran inspiración y mi mejor compañía. Son y seguirán siendo el mejor ejemplo a seguir en esta vida.

A mi hermano: Rubén

Mi mejor amigo en la vida, que siempre me has apoyado y ayudado en los momentos difíciles.

A mis abuelitos: Zeferino y Concepción
Antonio y Vicenta

Por el gran amor y cariño que siempre demostraron para nosotros, por sus consejos y por el gran amor y respeto a la vida que nos inculcaron.

A mis tíos:

Francisco, Ernestina, Aurelio, Pablo y María. Por las alegrías y los consejos que me dieron.

Enrique, Alfonso, Liliam, Antonio, Juan y Joaquín. Porque siempre estuvieron en el momento preciso y con la palabra exacta.

A mis primos:

Gracias a ustedes me pude desarrollar de una mejor manera, por ser amigos en todo momento y por estar siempre en el momento justo.

A mis amigos del CCH Sur: Raúl, Gerardo, Carlos, Fernando, Cesar y Marco.

A mis amigos del CENDI No. 28. Por todo el apoyo que me brindaron durante todo este tiempo y por enseñarme a valorar la vida.

A mis amigos de la Facultad: Armando, Valeria, Ma. Elena, Siriobska, Eréndira, Mariana, Yvonne, Rashidi, Lilliana, Claudia. Por haberme permitido conocerlos y pasar momentos excelentes con ustedes.

Al Dr. Raúl Barrera: Por la confianza depositada en mi y por la transmisión de sus experiencias.

A Cristina Negrete: Por tu paciencia al enseñarme.

A DIOS. Porque me diste la vida y me permitiste conocer a toda esta gente que me ha ayudado en mi camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, porque me permitieron alcanzar un sueño.

A mis maestros, que me ayudaron en mi formación.

A México.

HAKUNA MATATA

El cáncer es una enfermedad que implica cambios en el material genético de una célula, la mayoría de los cuales alteran el ciclo celular. El cáncer de pulmón es una de las causas de muerte más frecuente en el mundo, ocupando el segundo lugar según la OMS. Uno de los factores que son más importantes en el tratamiento del cáncer, es la resistencia química a fármacos que estos desarrollan. La multiresistencia es un fenómeno que implica que los tumores desarrollen resistencia a un amplio espectro de fármacos que no tienen relación estructural entre ellos y a los que no han sido expuestos. Este es un problema que se presenta comúnmente en el tratamiento de tumores. Son varios los mecanismos que comprende la resistencia a fármacos, entre ellos se encuentran la sobreexpresión de algunos genes, como MDR1, MRP y GST. Estos genes y sus productos convierten en refractaria a la célula, dando como resultado una disminución en la concentración de fármaco dentro de la misma, evitando así la muerte celular. Otro mecanismo descrito es la disminución en la expresión de Topo II, así como cambios en su actividad catalítica. Recientemente se describió otro mecanismo que involucra a la Topo II, que es una alteración en su compartimentalización dentro de la célula, ya que su localización en citoplasma le confiere resistencia a la célula. INER-37 es una línea celular de cáncer de pulmón que presentó una resistencia incrementada a etopósido (VP-16), el cual es un inhibidor específico para Topo II alfa. Al estudiar la expresión del gen de Topo II alfa mediante RT-PCR, se encontró que esta fue positiva. Estas células también expresaron ARNm para otros genes como: MDR1, MRP y Topo II beta. Al analizar la actividad enzimática de Topo II se encontró una disminución en la concentración de la enzima en fracción nuclear, sin embargo al realizarlos con extractos totales se observó actividad. Los estudios de inmunohistoquímica indicaron que la Topo II alfa se encontraba primordialmente en el citoplasma. La resistencia a VP-16 en INER-37 se debió a la localización citoplasmática que presentó Topo II alfa.

INTRODUCCION

El cáncer es una serie de enfermedades, en cada una de las cuales están involucradas varias alteraciones genéticas, en donde en la mayoría de ellas, los mecanismos que gobiernan la regulación del ciclo celular y la proliferación celular sufren cambios. (1).

Varias evidencias apoyan el hecho de que el cáncer es una enfermedad que tiene como resultado la evolución clonal de células transformadas. El cáncer se origina de una suma de mutaciones heredadas (línea germinal) o adquiridas (somáticas) que se dan en genes cuyos productos parecen tener un papel importante en la regulación del ciclo celular(2). Algunas de estas mutaciones pueden proveer ventajas a las células transformadas y dominan sobre las células normales. Varios factores etiológicos son los que pueden derivar en una transformación maligna. Tumores como el retinoblastoma parecen surgir de un componente netamente heredado, mientras que otros tumores como los de pulmón, vejiga y cavidad oral se desarrollan a partir de interacciones entre el genoma y el medio ambiente(2).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE PULMON

Según datos proporcionados por la Organización Mundial para la Salud (OMS) en el año de 1993, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte en todo el mundo y en los últimos años el número de casos se ha incrementado notablemente (3). Uno de los tipos de cáncer que ha aumentado su incidencia es el de carcinoma primario de pulmón. Los datos epidemiológicos en Estados Unidos mostraron que en 1995 se presentaron 177,000 casos nuevos, así como 158,700 muertes (4,5). Sin embargo en los últimos años la incidencia de cáncer de pulmón en hombres ha tenido un ligero decremento en este país, mientras que en mujeres la incidencia es aun creciente, y ha sido uno de los mayores problemas de salud pública por varias décadas (3). En 1996 en México, la Dirección General de Estadística e Informática reportó que

los tumores malignos ocuparon el 2º lugar como causa principal de muerte, sólo superados por las enfermedades cardiovasculares. Dentro de los tumores malignos el cáncer de pulmón, bronquios y de tráquea ocuparon el 1º. lugar por encima de los tumores de estómago y de cérvix, presentando una tasa de mortalidad de 6.4 por cada 100,000 habitantes (6). En un estudio realizado en el INER se encontró que la frecuencia con cáncer de pulmón había aumentado en los últimos años. Tanto en hombres como en mujeres, y afecto primordialmente a la población de 61 a 70 años(7).

Se estima que la adicción al cigarrillo es responsable del 80% de los tumores de pulmón y sólo del 30% de los otros tipos de cáncer. Otros factores como la dieta, hormonas, factores genéticos o raciales se han asociado también al desarrollo de los tumores del pulmón. Los tipos histológicos asociados con el cigarrillo son principalmente el carcinoma epidermoide y el cáncer de células pequeñas. El adenocarcinoma, sin embargo no está asociado fuertemente a tabaquismo.

En los últimos años, la distribución de los tipos histológicos de cáncer de pulmón han cambiado. A finales de los 70's y hasta principios de los 80's se presentó un incremento en los casos de adenocarcinoma de pulmón (8,9). El cambio de los tipos histológicos de cancer de pulmón ha sido atribuido a cambios en cuanto al consumo de cigarrillos, así como al tipo de cigarrillos que se consumen (10,11)

En México el principal componente histológico del cáncer de pulmón que se presenta es el adenocarcinoma (47%), en segundo lugar está el del tipo epidermoide(37%) y por último el carcinoma de células pequeñas (10%) y en menor frecuencia se presentan los del tipo escamoso, mixto y células grandes (7).

El cáncer de pulmón es una de los neoplasmas más difíciles de tratar (por quimioterapia, radioterapia o cirugía) y desafortunadamente aún no se tienen esquemas efectivos de tratamiento(12,13). No existe una gran variedad de tratamientos y el uso de la radioterapia y la quimioterapia son paliativos y muy raramente se prolonga la vida del

paciente. En países como Estados Unidos, la sobrevivencia de los pacientes con cáncer de pulmón a 5 años es tan solo del 11-13% (4,5).

I.2 RESISTENCIA QUIMICA A FARMACOS

La quimioterapia es una de las formas más utilizadas para combatir el cáncer. La experiencia que se tiene en este campo es amplia y es por eso que algunos tumores como el linfoma de Hodgkin, el linfoma de células grandes, la leucemia linfocítica aguda y el cáncer testicular son curables. Sin embargo hay muchos otros tumores en los que aún no se ha tenido éxito con la quimioterapia (14). El carcinoma de ovario, el carcinoma de células pequeñas de pulmón, los mielomas, el linfoma no-Hodgkin y el cáncer de mama en estadios avanzados, son tumores en los que generalmente al principio del tratamiento con quimioterapia se obtiene una respuesta satisfactoria, pero frecuentemente se observan recurrencias en las que por lo general las células tumorales se vuelven resistentes a los fármacos, de tal forma que causan la muerte del paciente (15). Es por eso que se ha incrementado el interés por estudiar los mecanismos que hacen que las células se vuelvan resistentes a distintos tipos de fármacos.

Varios factores pueden estar involucrados en la poca efectividad de la quimioterapia, algunos de los cuales son: a) eventos farmacocinéticos; b) la biología y el tipo de tumor, c) la respuesta intrínseca del paciente; d) la ubicación del tumor en sitios santuarios inaccesibles a las drogas; y e) la resistencia celular a los fármacos (15). Siendo este último el obstáculo más grande para obtener un tratamiento exitoso contra el cáncer.

El fenómeno conocido como resistencia múltiple a fármacos o MDR ("multidrug resistance"), se define como la capacidad que presentan las células tumorales de resistir la acción citotóxica de una gran variedad de fármacos que no tienen ninguna relación estructural ni funcional, después de que han sido expuestos a uno solo de ellos (16). Los primeros estudios acerca de este fenómeno se realizaron en líneas celulares

murinas y posteriormente en humanas; estos mostraron que aquellas líneas que habían sido seleccionadas para un agente antineoplásico específico como adriamicina (Adr), también presentaron resistencia a otros agentes antineoplásicos, tales como epipodofilotoxinas (VP-16 y VM-26) y aminoacridinas (m-AMSA)(15).

Se conocen dos tipos de mecanismos de resistencia a fármacos: el intrínseco y el adquirido. En el mecanismo adquirido las células se vuelven resistentes cuando han sido expuestas a algún agente citotóxico. El mecanismo intrínseco se presenta cuando las células del tumor son refractarias a la quimioterapia de *novus*.

Sobre los mecanismos moleculares que producen la resistencia intrínseca se conoce poco. En cambio, de la resistencia adquirida se sabe que una célula tumoral desarrolla diferentes mecanismos por la exposición continua a un fármaco. Entre estos se presentan: alteraciones en la permeabilidad de la membrana; alteraciones en el transporte de los fármacos (hacia el interior o hacia el exterior); cambio en la cinética de enzimas blanco; amplificación génica de las enzimas y sustratos; y cambios en la susceptibilidad al daño producido por las drogas (17,18).

La resistencia múltiple a fármacos involucra a varias proteínas de la células, entre ellas podemos contar a proteínas de la membrana como MDR-1(19) y MRP (20-22) que son bombas que ayudan a la célula en la detoxificación. Ambas pertenecen a la superfamilia de proteínas transportadoras denominada ABC (del inglés "ATP-binding cassette") en donde se incluye también el gen de fibrosis quística (CFTR)(23,26). También están relacionadas enzimas citoplasmáticas como las transferasas de glutation (GST), mismas que tienen un papel importante en la detoxificación de la célula. Otras enzimas también relacionadas son aquellas que son blanco para diferentes fármacos, entre las más importantes encontramos a las Topoisomerasas.

I.2.1 GLICOPROTEINA-P

En 1973, Dano (24) propuso la idea de un mecanismo activo de extrusión de fármacos en células tumorales , no fue sino hasta 1976 que Juliano y Ling (25) reportaron la expresión incrementada de una proteína de membrana de 170 kDa, la cual fue designada como glicoproteína-P. Durante diez años se siguió observando este aumento en la expresión de esta proteína, y su papel en la resistencia fue demostrado al transfectar ADNc de gp-170 en células sensibles a fármacos, mismas que adquirieron el fenotipo de resistencia (26,27).

La glicoproteína-P contiene una región transmembranal (dominio transmembranal o DT) y una región citoplasmática con capacidad de unir nucleótidos (Dominio de unión a nucleótido o DUN). Esta proteína está constituida de dos mitades con una alta similitud, cada una de las cuales contiene un DUN conectado por una secuencia conectora. Esta estructura se duplica en tandem (en fila) y contiene doce segmentos DT. Los sitios de unión para ATP de esta proteína se localizan en la región citoplasmática, mientras que varias de las secuencias DT se unen a través de secuencias extracelulares (28)(FIG. 1).

En humanos el gen para glicoproteína-P se encuentra localizado en el cromosoma 7q21.1. El gen MDR-1 consiste de 28 exones, mismos que codifican para una proteína de 1280 aminoácidos. Existe un segundo gen denominado MDR-2, que codifica para una proteína parecida a la glicoproteína-P , sin embargo, solo el gen MDR-1 esta involucrado en la resistencia múltiple a fármacos (27).

Muchas evidencias apoyan la idea de que la gp-P actúa como una bomba de eflujo o de transporte de amplia especificidad. Estas se basan en las semejanzas de la estructura terciaria y la secuencia de aminoácidos con proteínas del sistema de transporte en *Escherichia coli* (*alfa-hermolisina* y *malk*).Esta proteína requiere de energía para llevar a cabo su función (29).

El mecanismo de acción por el cual la gp-P reconoce y expulsa fármacos de diferente naturaleza química aún no se conoce; sin embargo se postula que varios fármacos se unen a sitios específicos localizados en la región citoplásmica de la molécula y después son transportados en forma activa fuera de la célula. Otra teoría propone que gp-P funciona como enzima del tipo "flip-flop" e involucra un sitio de unión en la región lipídica de la membrana y el otro en la proteína misma (15). Otros datos experimentales sugieren que la gp-P también funciona como un canal de cloro (19).

Este gen no solo se expresa en tejidos tumorales, también se ha encontrado expresado en distintos órganos y tejidos normales. La distribución de gp-P en órganos involucrados en la detoxificación como el riñón, vejiga, hígado, etc., así como su localización sobre la superficie luminal de los vasos del tejido cerebral, sugieren que esta proteína desempeña un papel fisiológico normal en el transporte de compuestos tóxicos o metabolitos que pueden ser perjudiciales para el organismo (15).

1.2.2 RESISTENCIA MULTIPLE A FÁRMACOS MEDIADA POR MRP

La línea celular H60AR de células pequeñas de pulmón es una de las mejor caracterizadas en la resistencia a fármacos mediada por una proteína no relacionada con glicoproteína-P (30). De estas células fue aislado un ARNm de 6.5 kb que codifica para una proteína de 1531 aminoácidos llamada MRP(31). Al revisar su secuencia de bases y los dominios de organización, se observó, que al igual que la glicoproteína-P, también pertenecía a la superfamilia de transportadores ABC (31). El peso aproximado de esta proteína es de 190 kDa (32).

En un principio la sobreexpresión de este gen fue asociada con amplificación génica, por lo que el producto por si mismo no confería resistencia. Sin embargo, la transfección del gen de MRP a células HeLa convirtió a estas células resistentes a varios agentes quimioterapéuticos. Estos estudios establecieron que la sobreexpresión de MRP fue suficiente para causar resistencia en estas células(32).

La sobreexpresión de MRP no se limita únicamente a líneas celulares establecidas de tumores de pulmón, ni tampoco se restringe a aquellas seleccionadas para un solo fármaco. Estos datos sugieren que MRP puede ser un mediador común de resistencia, al menos bajo condiciones *in vitro*. Su verdadero papel en la resistencia no ha sido bien definido como en el caso de gp-P. En líneas celulares de tumores de pulmón variedad células pequeñas, MRP parece desempeñar un papel importante en la resistencia a fármacos, no así en la variedad de células no pequeñas (28).

El gen de MRP en humanos está ubicado en el cromosoma 16p13 (31). A nivel de aminoácidos, la similitud entre la proteína MRP y gp-P es de menos del 15%(28). Esta proteína esta constituida por dos partes, cada una de las cuales contiene un dominio membranal hidrofóbico y un dominio hidrofílico aceptor de nucleótidos (DUN). Las dos mitades de la molécula están unidas por una región conectora y, en contraste con la glicoproteína-P, éstas no son simétricas (26).

La forma en que MRP confiere resistencia a fármacos no se conoce completamente. La semejanza estructural con gp-P sugiere una actividad homóloga para la expulsión de fármacos. No obstante, se necesitan hacer experimentos para establecer si funciona como una bomba de eflujo como la glicoproteína-P (33).

La relación que existe entre la reducción en la concentración de fármacos y un aumento en el eflujo de los mismos con la sobreexpresión de MRP se presenta con menor frecuencia que con la que se presenta la gp-P (34). La localización de esta proteína ha sido reportada con mayor frecuencia en el retículo endoplásmico, aunque también se ha localizado en la membrana plasmática (35). Otros estudios indicaron que MRP puede funcionar como un transportador dependiente de ATP para un conjugado de glutation con leukotrieno, un potente ácido araquidonico relacionado con la comunicación intercelular y con señales de transducción (28).

Varios estudios encontraron niveles elevados de expresión para MRP en pulmón, testículo y músculo, mientras que en otros tejidos normales la expresión fue baja (31).

I.2.3 TRANSFERASAS DE GLUTATION

Las transferasas citosólicas de glutatión (GSTs) son una gran familia de enzimas diméricas capaces de detoxificar a varios electrofilos carcinogénicos (36). Las transferasas de glutatión se dividen en tres clases: la clase α , la clase μ y la clase π . De los cientos de componentes del humo del tabaco, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) parecen ser sus principales sustratos. Estas enzimas pueden inactivarlos por medio de la conjugación con glutatión intracelular (GSH), produciendo una forma inactiva de metabolitos solubles en agua. (37) La variación interindividual en la función de las GST's puede estar relacionada a las diferencias en el riesgo para desarrollar cáncer por tabaquismo. La presencia o ausencia así como en el número de copias del gen para GST- μ parece determinar la actividad de la enzima en el pulmón. Los fumadores con la enzima GST- μ tienen aproximadamente un tercio de riesgo para padecer carcinoma de pulmón que aquellos fumadores sin la enzima (38).

Una hipótesis atractiva surgió a partir de una observación inicial sobre el incremento de la actividad de la glutatión transferasa S (GST) en una línea celular resistente a fármacos (39,40); así como con los sistemas de detoxificación basados en glutatión que protegen a los tejidos normales de daños químicos, pero que también pueden proteger a los tejidos malignos de agentes quimioterapéuticos (41). Parecía muy posible que el metabolismo relacionado a glutatión pudiera cooperar con el eflujo de fármacos por parte de la glicoproteína-P (41).

Aunque la capacidad para conjugar sustratos con glutatión (GSH) es la actividad definida de GSTs, no existe evidencia alguna de que los fármacos relacionados con resistencia sean conjugados con glutatión en la ruta de detoxificación y eliminación. Específicamente, los conjugados con doxorubicina, vincristina, etoposidos y actinomicina D no se han descrito. La única excepción puede ser la participación de la

GST microsomal, una enzima unida a membrana que es diferente estructuralmente a GST citosólica, en el metabolismo de mitoxantrona (42). En contraste, la conjugación de GSH mediada por GST citosólica a agentes antineoplásicos no relacionados a resistencia como clorambucil (43,44) y melfalan (45) han sido muy bien documentadas.

Es posible que las isoenzimas GSTs puedan detoxificar estos fármacos a través de otras vías que no sean la conjugación de glutatión. (41) Las GSTs unen sustancias hidrofóbicas con una afinidad alta y pueden participar en el transporte intracelular y el secuestro de estas moléculas (46). De esta manera, estas isoenzimas pueden proteger a las células de toxinas y prevenir que interactúen con blancos celulares importantes. Por lo tanto, se ha propuesto que el papel de las GSTs en la resistencia a fármacos puede ser unir a los fármacos y llevarlos a la glicoproteína-P para expulsarlos de la célula (47). Por otra parte, existen más evidencias que relacionan a las GSTs y a MRP, en donde probablemente MRP es utilizado como canal de eflujo para los compuestos que son metabolizados por las GSTs.

Aunado a la susceptibilidad genética, la expresión de GST puede estar relacionada con la quimioresistencia. Un mayor número de evidencias sugiere que las enzimas dependientes de glutatión son un factor importante en la determinación de la sensibilidad de los tumores de pulmón y de líneas celulares a agentes citotóxicos (48,49). En particular, bajos niveles en la expresión de GST- π en líneas celulares de cáncer de pulmón (variedad células pequeñas) correlacionaron una alta sensibilidad para cisplatino y carboplatino, mientras que lo contrario se presentó en líneas celulares de cáncer de pulmón variedad células no pequeñas, las cuales expresan altos niveles y menor sensibilidad (50). Por ejemplo, la línea celular resistente a fármacos, H69AR, seleccionada para doxorubicina, presentó resistencia cruzada a una gran variedad de agentes antineoplásicos naturales pero no sobreexpresó glicoproteína-P(51). Diferencias marcadas en los niveles de GSH y en las actividades de tres de las cuatro enzimas relacionadas con GSH fueron observadas entre la línea celular H69AR y su línea celular parental.

Finalmente, también se ha observado un incremento en la actividad de GSTs en varios modelos de resistencia a fármacos, pero no se conoce si se trata de una reacción contra tensión o que bien que GSTs tengan un papel específico en la defensa de a célula. Las GSTs pueden ser factores importantes en la alquilación de agentes antineoplásicos. (41)

II. RESISTENCIA MEDIADA POR TOPOISOMERASA II

Las topoisomerasas son enzimas nucleares que desempeñan funciones vitales para las células. La primera topoisomerasa descubierta fue la Topoisomerasa I de *Escherichia coli* en 1971 (53) y posteriormente la ADN girasa o Topoisomerasa II también de *E. coli* en 1976 (54). Desde entonces, las topoisomerasas han sido encontradas en todas las células procariotas y eucariotas que se han estudiado. Además, algunos fagos y virus animales también codifican sus propias topoisomerasas.

Las actividades que realizan las topoisomerasas (Topo) son importantes para muchos procesos celulares, dentro de los que se incluyen recombinación, transcripción y segregación de los cromosomas (55). Además permite la separación de las moléculas recién sintetizadas de ADN en la duplicación (56).

El papel que juegan en la condensación de los cromosomas y la separación de las cromátidas es esencial para la supervivencia de la célula. (57). Las Topo parecen tener un papel en el mantenimiento de la estructura de los cromosomas y también parecen ser uno de los componentes mayoritarios en la matriz nuclear que forma la base de los asa cromosomales. (57) Estas proteínas presentan dos tipos de funciones: estructurales y catalíticas.

Para llevar a cabo su actividad catalítica, estas enzimas forman una unión covalente con el ADN, produciendo una ruptura transitoria por el corte de una o de las dos hebras, y pasando en un segundo evento una de éstas a través del hueco, para

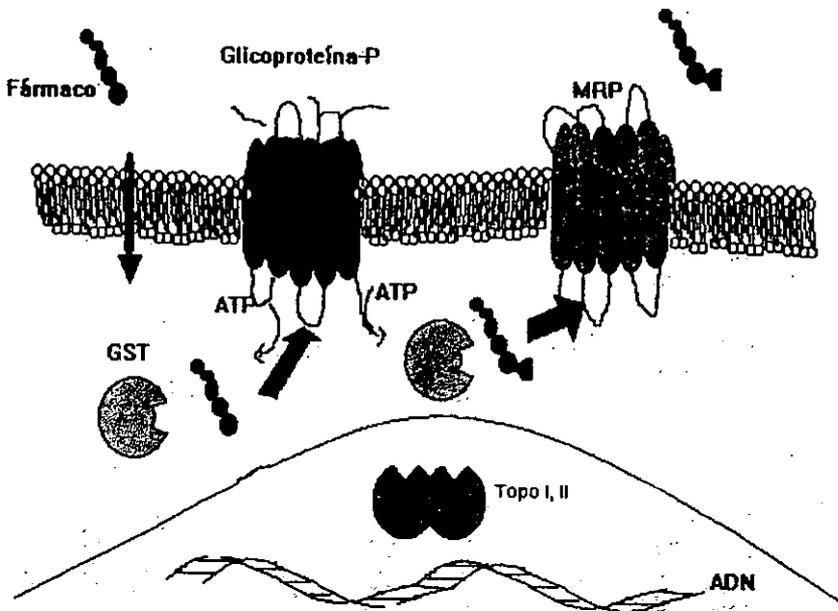


FIG. 1. Representación esquemática de algunos mecanismos que confieren resistencia múltiple a fármacos. Dentro de estos se encuentran varios genes con una alta expresión, tales como MRP, MDR-1 y GST's. Cuando el fármaco penetra a la célula tumoral, esta lo puede expulsar de su interior utilizando a la glicoproteína-P sin necesidad de ser metabolizado. La proteína MRP también puede realizar este trabajo, sin embargo es necesario que al fármaco le sea unido un grupo glutatión por medio de las glutatión transferasas. MRP reconoce al fármaco con el glutatión y lo expulsa fuera de la célula. Otras proteínas importantes son las Topoisomerasas (I,II) ya que son blanco para varios de los fármacos más utilizados en esquemas de quimioterapia. Cuando estas enzimas presentan alteraciones en su expresión, actividad catalítica o localización la acción del fármaco no es eficiente.

después cerrarlo al unir las dos hebras. La topoisomerasa tipo I (Topo I) genera únicamente un rompimiento en una hebra del ADN y libera la tensión torsional al desenrollarse la hélice. Las topoisomerasas tipo II (Topo II) generan dos rompimientos, uno en cada una de las hebras de ADN, que también liberan la tensión torsional. A diferencia de las Topoisomerasas tipo I las topoisomerasas tipo II requieren de ATP y de magnesio para sus actividades.

Las enzimas Topo II son blancos para una gran variedad de agentes terapéuticos, incluyendo antiparasíticos, antifúngicos, antivirales, y fármacos antineoplásicos. En mamíferos la Topo II fue identificada como un blanco celular de varios agentes citotóxicos, incluyendo a algunos fármacos antineoplásicos importantes (55).

En humanos se presentan dos isoformas de la Topo II; una de 170 kDa que es la Topoisomerasa II alfa y otra de 180 kDa la Topoisomerasa II Beta (58,59)

Aunque los mecanismos catalíticos de las dos isoformas, alfa y beta, son probablemente los mismos, estas presentan propiedades diferentes que pueden ser importantes, particularmente con respecto a su interacción con agentes antineoplásicos y con el desarrollo de la resistencia a fármacos.

II.1 CICLO CATALITICO DE LA TOPOISOMERASA II (TOPO II)

El ciclo catalítico de la Topo II es complejo y aun no se comprende completamente. Este se describe como una serie de pasos que incluyen la unión de la enzima a la doble cadena de ADN y el rompimiento de esta última , pasando una de éstas hebras a través del rompimiento realizado en la otra hebra, y la religación de ésta. Posteriormente la enzima se libera y queda en posibilidad de llevar a cabo otro evento (Fig. 2).

Específicamente, el primer paso del ciclo catalítico de la Topo II implica la formación de una unión covalente entre la enzima y la cadena de ADN. La especificidad



FIG. 2. Actividad catalítica de Topoisomerasa II e inhibición por fármacos:
A) Dimerización de la proteína en núcleo
B) Unión a la doble cadena de ADN
C) Fragmentación de cada una de las hebras para disminuir la torsión
D) Unión del fármaco a la Topoisomerasa II e inhibición de la actividad de ligasa

de esta interacción parece estar relacionada con la secuencia de los nucleótidos y la topología del ADN (26). Sin embargo, para su actividad óptima la enzima parece necesitar de 16 a 28 pares de bases localizadas simétricamente del sitio de rompimiento (26). La topología del ADN es también importante para el reconocimiento. Los sitios de unión al ADN no están uniformemente distribuidos a lo largo de la molécula pero están agrupados en regiones específicas como lo son aquellas donde se encuentran las regiones intergénicas y las unidades de transcripción (26).

Después de la unión al ADN en la secuencia de reconocimiento por la Topo II, se da el corte en ambas hebras de la cadena de manera coordinada. Esta reacción de corte está en equilibrio con una reacción de religación, e *in vivo*, ambas reacciones requieren de magnesio. La Topo II al unirse al ADN lo hace mediante una unión covalente con un residuo de tirosina de una de sus dos subunidades (60) y forma un puente. La tirosina que se une al ADN se encuentra en la posición 804 en la Topo II alfa en humanos y en la posición 821 en la Topo II beta.

Después de haberse creado el doble rompimiento en la molécula de ADN, la Topo II lleva a cabo el paso de la hebra intacta a través del rompimiento o hueco de la otra hebra. Este movimiento de una hebra a través de la otra aun no es completamente entendido. Existe evidencia que sugiere que la unión del ATP a la proteína y su hidrólisis controla la apertura y cierre del puente formado por la enzima (26).

Una vez que la hebra pasó, la Topo II vuelve a unir la fractura en la molécula de ADN. Esta reacción de religación es fuertemente favorecida. Al llevarse a cabo la religación de las hebras, el ATP es hidrolizado, y la conformación activa de la enzima es regenerada. La enzima puede separarse del DNA, ya modificado o bien puede iniciar otro ciclo.

Ciertas clases de agentes antineoplásicos ejercen su acción citotóxica al interactuar con la Topo II e impedir que complete su ciclo catalítico. Este tipo de fármacos son conocidos como inhibidores de topo II. Diferentes fármacos pueden

actuar en distintos pasos de su ciclo catalítico.

II.2 ESTRUCTURA Y REGULACION DEL GEN DE TOPO II alfa

La Topo II de eucariontes ha sido purificada de un gran número organismos, incluyendo la levadura, *Drosophila*, células HeLa, y otras líneas tumorales de mamíferos. El gen de Topo II α ha sido clonado y secuenciado de varios organismos, tales como levadura y *Drosophila*, humanos (61), ratón, hamster y rata(28). El gen de Topo II alfa en humano ha sido mapeado en el cromosoma 17q21-22(61).

Con base en estudios de purificación de la enzima, se ha podido deducir la secuencia de aminoácidos, y se ha determinado que esta proteína forma un homodímero, en donde cada subunidad consiste de por lo menos tres dominios funcionales: la región del amino terminal que contiene la región donde se une el ATP, una región central donde se encuentra el sitio de unión al ADN y la región del carboxilo terminal. El dominio del amino proximal abarca aproximadamente los primeros 450 aminoácidos y contiene tres motivos conservados típicos de DUNs. El dominio central es de aproximadamente 750 aminoácidos y contiene a la tirosina que es lugar donde se une covalente al ADN. Una región de cierres de leucina, que puede ser importante en la interacción proteína-proteína, se encuentra también en esta región en la isoforma alfa pero no así en la beta. El dominio del carboxilo terminal comienza aproximadamente en el aminoácido 1200. Esta región de la proteína es muy hidrofílica y es la parte que más diverge entre Topoisomerasas II de distintas especies, tanto en su tamaño como en su secuencia. El carboxilo terminal de la Topo II no parece ser esencial para la actividad catalítica de la enzima (61).

II.2.1 TOPOISOMERASA II BETA (TOPO II BETA)

La existencia de una segunda forma de la Topo II de un mayor peso molecular (180 kDa) fué primero detectada en una línea celular murina y en humanos en una línea celular monocítica. (63) Esta isoforma aunque poseía una secuencia muy similar a la de Topo II alfa, era diferente y fué designada Topoisomerasa II Beta (Topo II Beta).

Cuando fue secuenciado completamente el gen de Topo II beta de humano se observó que la región del carboxilo terminal divergía significativamente de la otra isoforma (58) no así el extremo amino proximal .

El gen para Topo II beta esta localizado en el cromosoma 3p24 (59). Sin embargo las dos isoformas están más altamente relacionadas entre ellas que con las topoisomerasas de otras especies, y la similitud a nivel de aminoácidos entre alfa y beta es del 72%. La isoforma alfa tiene 4590 nucleotidos que codifica para una proteína de 1530 aminoácidos, mientras que la isoforma beta tiene 4863 nucleótidos que codifica para una proteína de 1621 aminoácidos(58). A pesar de el alto grado de similitud entre los ARNm, las dos isoformas de Topo II presentan algunas diferencias bioquímicas, que en parte podrían explicar sus diferencias en función (63).

II.2.2 REGULACION DE LA EXPRESION GENICA Y ACTIVIDAD CATALITICA DE TOPO II

Existen varias formas en las que la actividad enzimática de la Topo II alfa puede ser regulada. En varias líneas celulares se ha encontrado que , los niveles de las Topo II alfa, así como de su actividad, varían a través del ciclo celular (65). La síntesis de la Topo II alfa se lleva a cabo cuando la célula progresa de la fase G₁ a la fase S, con un nivel máximo de expresión en G₂ y mitosis. Después de la mitosis la mayoría de la proteína es degradada. De esta manera, la actividad y la expresión disminuyen al mínimo y la mayoría de Topo II α en algunas células esta regulada por la fase del ciclo celular en el cual se encuentra la célula. En cambio, en células de mamíferos, los niveles de Topo II beta se mantienen constantes durante todo el ciclo celular (64,65).

La actividad de Topo II puede ser también regulada por los niveles de fosforilación, aunque se conoce poco sobre este evento. La Topo II puede ser un sustrato de una gran variedad de cinasas *in vitro* por ejemplo la proteína cinasa C (PKC), cinasa de caseína II (66). La fosforilación *in vitro* de Topo II, normalmente

incrementa la actividad catalítica o de corte de la enzima (66). Existe también evidencia de que la fosforilación tienen un papel en la localización de la Topo II en el núcleo de levadura (66).

La fosforilación para Topo II ha sido demostrada *in vivo* en eucariontes inferiores así como en células de mamíferos y aves. Los niveles de fosforilación varían y son muy bajos en células que se encuentran en estado de quiescencia (en reposo, sin dividirse), mientras que encuentran en su nivel más alto entre la fase G₂ y M. Así, la regulación de la actividad de Topo II mediante fosforilación puede diferir de la actividad dada por la concentración de enzima expresada(26).

Estudios de fosforilación *in vivo* de Topo II involucran análisis del mapeo de los fosfopéptidos en levadura y *Drosophila* y estos han mostrado que los mayores sitios de fosforilación *in vivo* son blancos para la cinasa de caseína II. La mayoría de los sitios de fosforilación para la cinasa de caseína II se cree están en la región del COOH-terminal, y esto se ha demostrado experimentalmente en levadura(26). Así, el papel exacto de la fosforilación y defosforilación en la regulación de la actividad enzimática o la localización de la Topo II en humanos se conoce solo parcialmente.

En algunos sistemas celulares, parece que la sensibilidad a un fármaco puede estar afectada por la fosforilación de Topo II, posiblemente por permitir que haya un gran número de religaciones en presencia del fármaco. Sin embargo, en otros sistemas, la fosforilación no parece tener un efecto apreciable.

También se ha sugerido que la actividad catalítica de la Topo II puede ser regulada por la poli(ADP-ribosilación). *In vitro*, se ha mostrado que Topo II purificada de timo es un sustrato para la poli(ADP-ribosa) sintasa y que la poli(ADP-ribosilación) puede inhibir la actividad catalítica de esta enzima(28).

II.2.3 LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA TOPOISOMERASA II

La localización intranuclear de las Topo II alfa y beta en mamíferos puede diferir. Estudios con anticuerpos sugieren que la Topo II alfa (170 kDa) se localiza en el nucleoplasma, mientras que la Topo II beta (180 kDa) está restringida en el nucleolo, al menos en células HeLa y K562. No obstante, estudios en fibroblastos de hamster utilizando anticuerpos policlonales contra Topo II alfa y beta, indicaron que las dos isoformas están presentes tanto en el nucleoplasma como en el nucleolo. Sin embargo, cuando se toman estos datos junto con la observación de que los niveles de Topo II alfa y beta pueden ser regulados durante la proliferación celular (64) y pueden diferir en su localización intranuclear, se pueden sugerir diferentes papeles para estas isoformas, en la estructura cromosómica y su función. Las dos isoformas probablemente también difieran en los papeles que juegan en la sensibilidad y resistencia a los diferentes fármacos con los que interactúan.

II.2.4 TOPOISOMERASA II COMO BLANCO PARA FARMACOS

Un gran número de agentes de quimioterapia contra el cáncer pertenecer a varias clases de químicos que son conocidos por ejercer su citotoxicidad, al menos en parte, a través de su interacción con la Topo II (Tabla I). Aunque su estructura es muy diversa, estos fármacos interactúan con la Topo II en al menos dos formas. Primero, aquellos que estabilizan el complejo Topo II-ADN e interfieren con la capacidad de la enzima para religar al ADN, como los antraciclinos (doxorrubicina), epipodofilotoxinas (VP-16, VM-26), antracenediones (mitoxantrona), elipticina (9-hidroxieliptixina) y aminoacridinas (amsacrina) (FIG. 2). Segundo, las que no estabilizan el complejo ternario pero su citotoxicidad se presenta por interferir en algún otro aspecto del ciclo catalítico de la Topo II, entre estos podemos contar otros fármacos, como el merbarone, derivados de bis(2,6-dioxopiperazin)(ICRF-193, ICRF-187), ciertas antraciclinas (aclaurubicina) y la fostriecina actúan más como típicos inhibidores de enzimas (26).

El corte del ADN por la Topo II y la religación del mismo ocurren antes y después del paso de la hebra a través del corte en la otra hebra, pero por razones aún

desconocidas, el complejo que se forma entre la Topo II y el ADN antes del paso de la hebra parece ser más susceptible a ser estabilizado por algunos fármacos. Algunos fármacos cuya toxicidad es acompañada por un incremento en el número de proteínas asociadas a ADN parecen estabilizar un grupo distinto de sitios de rompimiento en un segmento dado de la cadena. Sin embargo los dominios de interacción sobre la Topo II de fármacos específicos están poco definidos. Además, parece que los fármacos por si mismos pueden influenciar en la formación del complejo enzima-ADN. Los fármacos pueden aumentar la especificidad por secuencias al ADN, permitiendo que la enzima corte a la cadena en sitios nuevos o en sitios que no se cortaban frecuentemente en ausencia de los fármacos(26).

No todos los fármacos que interactúan con Topo II estabilizan los complejos enzima-ADN. Algunos de estos xenobióticos son tóxicos por su capacidad para inhibir otros aspectos del ciclo catalítico de la enzima. La manera exacta en que estos agentes inhiben la actividad así como su mecanismo, son desconocidos. De esta forma estos fármacos aparentemente interactúan con Topo II de diferentes formas.

TABLA I. Fármacos que interactúan con la Toposimerasa II

CLASES QUIMICAS	EJEMPLOS
Fármacos estabilizadores del complejo DNA-Topoisomerasa II	
Antraciclina	<i>Doxorubicina, daunorubicina</i>
Dimetilpiperidoloxinas	<i>VP-16, VM-26</i>
Acridinas	<i>Amsacrina</i>
Antracinediones	<i>Mitoxantrona</i>
Elipticinas	<i>2-Methyl-9-hydroxyelipticina</i>
Terpenoides	<i>Terpentecin, clerocidin</i>
Fármacos que no estabilizan el complejo DNA-Toposimerasa II	
Tiobarbituratos	<i>Merbarone</i>
Bisdioxopiperazinas	<i>ICRF-193, ICRF-187</i>
Antraciclina	<i>Aclarubicin</i>

II.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A FARMACOS CONTRA TOPO II

La resistencia a fármacos que se da por la estabilización de los complejos de corte, se presenta cuando pocos de estos complejos son formados. Esto puede ser debido a una reducción en los niveles de Topo II intranuclear; a una mutación en la enzima que altera la interacción de la Topo II con el fármaco o con el ADN, o con ambos. La caracterización bioquímica y molecular de los mecanismos de resistencia que involucran a Topo II ha sido llevada a cabo inicialmente en líneas celulares seleccionadas a fármacos.

II.3.1 NIVELES REDUCIDOS DE TOPOISOMERASA II

Cuando los niveles de Topo II están reducidos, el número de complejos enzima-ADN que se forman serán pocos, originándose de esta forma la resistencia. Contrario a esto, si existe un incremento en los niveles de Topo II en el núcleo puede resultar en un fenotipo de hipersensibilidad al fármaco (67).

La resistencia en líneas celulares seleccionadas ha sido asociada frecuentemente a los niveles reducidos de Topo II alfa, no así en líneas celulares no seleccionadas. En algunos casos, las propiedades enzimáticas de la Topo II en células resistentes parece estar alterada, pero no han sido caracterizadas en su totalidad. Varias líneas celulares han sido seleccionadas para una gran variedad de fármacos, incluyendo VP-16, DXR, mitoxantrona, m-amsacrina y 9-hidroxielipticina. Las bases moleculares de los niveles reducidos de Topo II alfa en al menos una de estas líneas celulares parece ser el resultado de un rearrreglo alélico del gen de Topo II alfa, resultando en la expresión de una forma aberrante del gen. De manera menos frecuente, los niveles reducidos de Topo II beta han sido observados en estas líneas celulares.

II.3.2 MUTACIONES PUNTUALES ASOCIADAS CON LA ACTIVIDAD ALTERADA DE TOPOISOMERASA II

Un número de líneas celulares seleccionadas a fármacos que han sido caracterizadas, contienen niveles reducidos de Topo II comparadas con sus líneas parentales. Además, por ensayos de actividades catalíticas han revelado que la enzima en las células resistentes poseen propiedades bioquímicas anormales. Otras líneas celulares seleccionadas contienen una Topo II anormal, pero los niveles de enzima inmunoreactiva son equivalentes a los de sus líneas parentales.

En algunas líneas celulares con actividades alteradas de Topo II alfa, se han identificado mutaciones puntuales. Por ejemplo, unas células de hámster seleccionadas para VM-26 llamadas Vpmr-5, se encontró que contenía una Topo II inestable a temperatura cuya capacidad para religar al ADN fue menos afectada por el fármaco que en la Topo II normal. Una mutación puntual que resultó en la sustitución de un glutámico por una arginina en la posición 493 fue identificada posteriormente en el gen de Topo II alfa de esta línea celular(26).

Un segundo ejemplo de una mutante de Topo II alfa en mamíferos se reportó en una leucemia mieloide seleccionada para m-AMSA, la HL-60/AMSA (68). Esta línea celular no presentó una resistencia cruzada a VP-16, pero fue resistente para m-AMSA y DXR. En ella se identificó una mutación en el ARNm, en la posición 486 que cambió una argina por una lisina. Una mutación idéntica se encontró en otra línea celular, también leucemia mieloide y seleccionada para m-AMSA, denominada KBM-3/AMSA(69).

Otro ejemplo lo constituye una leucemia seleccionada para VM-26, denominada CEM/VM-1 que presenta alteraciones en las actividades catalíticas y de corte de Topo II alfa. También se demostró una alteración en el requerimiento de ATP para esta mutante de Topo II alfa. Dos mutaciones en el gen de Topo II alfa se han identificado en esta línea celular (70). Una de estas mutaciones se da por el cambio de una arginina por un glutamato en la posición 449, mientras que la otra mutación involucra en

cambio de una prolina por una serina en la posición 802. Otra mutación puntual se encontró en otra línea celular, la CEM/VP-1, que fue seleccionada para VP-16(71). Esta mutación se localizó en la porción media de la molécula de Topo II alfa y hay un cambio de una lisina por una asparagina en la posición 797(71), aunque aun no se ha caracterizado la función de esta mutación.

Varias mutaciones se han caracterizado en el gen de Topo II alfa en líneas celulares seleccionadas para varios fármacos *in vitro*. Todas estas mutaciones parecen estar ubicadas en la región de unión a ATP de la proteína y a su vez estas regiones están delimitando a la tirosina del sitio activo. Sin embargo, solo en unos cuantos casos se ha demostrado del todo el papel que tienen estas mutaciones en el fenotipo de resistencia en células de mamíferos.

II.3.3 LOCALIZACION SUBCELULAR ALTERADA DE TOPOISOMERASA II

Además de las alteraciones cualitativas y cuantitativas de la Topo II que se han implicado en la resistencia a fármacos, existe un tercer mecanismo que involucra una alteración en la localización subcelular de la enzima. Este mecanismo de resistencia ha sido asociado con la resistencia en una leucemia seleccionada para mitoxantrona así como para otra línea celular la H209/V6, que fue seleccionada para VP-16. Esta última es una línea celular de cáncer de pulmón de la variedad células pequeñas, expresó una Topo II alfa más pequeña (160kDa) que la proteína normal (170kDa) encontrada en la línea parental. Además esta línea celular (H209/V6), expresó dos ARNm para Topo II uno de 6.1 kb, el aparentemente normal y otro más pequeño de solo 4.8 kb (72). Al realizarse ensayos de actividad enzimática para la Topo II alfa de 160 kDa en H209/V6 y la de 170 kDa de la línea parental se encontró que tenían actividades similares (73). Sin embargo, al realizarse un estudio de inmunohistoquímica y de fraccionamiento subcelular se encontró que la mayoría de la proteína de 160 kDa de la H209/V6 se encontraba localizada en el citoplasma, a diferencia de la proteína de 170 kDa de la línea parental (73). Estos resultados sugirieron que en H209/V6 se presentó una alteración en la Topo II α dando como resultado la proteína de 160 kDa que es menos eficiente para localizarse en el núcleo.

Un análisis posterior mostró que el ARNm de 4.8 kb presentaba una delección de aproximadamente 1 kb con respecto al ARNm de la línea parental (6.1kb)(74). Esta región deletada del ARNm comprende la pérdida de 75 aminoácidos del carboxi-terminal de la proteína que contiene secuencias de localización nuclear , algunas de las cuales son esenciales para el transporte eficiente de la proteína hacia el núcleo(75).

ANTECEDENTES

INER-37 es una línea celular humana perteneciente a un adenocarcinoma de pulmón. Esta línea celular fue analizada por su patrón de resistencia a distintos fármacos utilizados en quimioterapia, mediante un ensayo de citotoxicidad (74). Los resultados mostraron que INER-37 presentó resistencia incrementada a VP-16 (etopósido, inhibidor de topoisomerasa II). Al comparar el grado de resistencia de la línea INER-37 con otra línea la A-427, que es también un adenocarcinoma de pulmón, se encontró que el IC_{50} (índice de citotoxicidad) de INER-37 fue 6 veces mayor. (figura 3). Sin embargo, el grado de resistencia a VP-16 no fue compartido hacia otros fármacos, ya que INER-37 presentó una alta sensibilidad a la mayoría de los fármacos relacionados con la multiresistencia, tales como: doxorubicina (DXR), Captotecina (CPT), 5-Flu. MTX, Ara-C y otros (Tabla II).

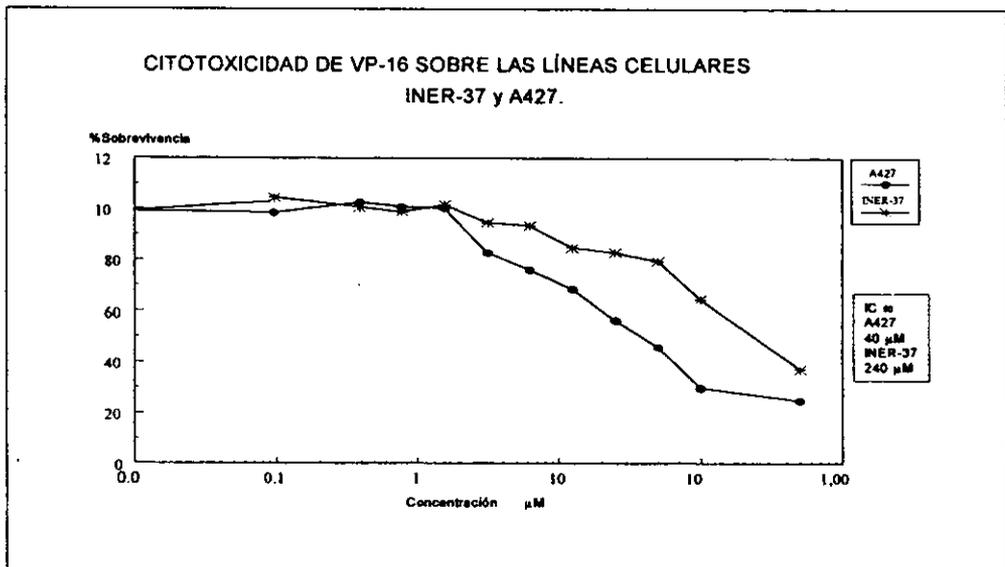


Fig. 3 Curvas de citotoxicidad de VP-16 sobre INER-37 y A-427.

Tabla II. Valores de IC₅₀ de distintos fármacos obtenidos de la línea celular INER-37

INDICES DE CITOTOXICIDAD EN LA LINEA CELULAR INER-37	
Fármaco	(IC ₅₀) mM
Etopósido (VP-16	
Experimento 1	70
Experimento 2	200
Experimento 3	240
Experimento 4	220
Tenipósido (VM-26)	
Experimento 1	8.7
Experimento 2	11
Experimento 3	22
Experimento 4	8
Doxorrubicina (DXR)	
Experimento 1	0.6
Experimento 2	1.5
Experimento 3	1
Camptotecina (CPT)	
Experimento 1	18
Experimento 2	32
Experimento 3	6
Experimento 4	2
Ciclofosfamida	25
5-Fluorouracilo (5FU)	> 100
Metotrexate (MTX)	> 100
Arabinócido de citocina	> 100

Debido a que VP-16 tiene como blanco a las enzimas nucleares Topo II, era probable que pudiera existir una alteración en estas enzimas (mutaciones, cambios en la expresión o alteraciones en su localización celular)

OBJETIVO

Identificar si existen alteraciones en la localización de la enzima topoisomerasa II alfa que puedan conducir al aumento en la resistencia a etoposido en la línea celular INER-37.

HIPOTESIS.

La resistencia a VP16 en INER-37 es un fenómeno que puede ser producido por una alteración en la localización de la enzima topo II alfa.

OBJETIVO

Identificar si existen alteraciones en la localización de la enzima topoisomerasa II alfa que puedan conducir al aumento en la resistencia a etoposido en la línea celular INER-37.

HIPOTESIS.

La resistencia a VP16 en INER-37 es un fenómeno que puede ser producido por una alteración en la localización de la enzima topo II alfa.

MATERIAL Y METODOS

Cultivo Celular.

La línea denominada INER-37 corresponde a una línea celular tumoral obtenida a partir de una muestra de derrame pleural de un paciente con cáncer de pulmón y virgen al tratamiento con quimioterapia.

Esta línea fue adaptada al crecimiento en medio RPMI-1640; durante los primeros meses de cultivo presentó un crecimiento lento y posteriormente éste se incrementó. En los primeros cultivos, INER-37 presentó polimorfismo, con células alargadas de núcleo central y con uno a dos nucleolos. Estas células llegan a formar agrupaciones en forma de colonias que asemejan estructuras glandulares. Un análisis inmunohistoquímico reportó que esta línea celular fué positiva para PAS, y negativa para queratina con formación de una cantidad de AgNor (nucleolos). Debido a estas pruebas, el tipo histológico fue identificado como variedad histológica de adenocarcinoma.

La línea celular A-427 corresponde a una adenocarcinoma de pulmón, mientras que la línea HeLa es un carcinoma epidermoide de cáncer de cérvix. Ambas líneas celulares fueron obtenidas del reservorio ATCC.

Las líneas celulares INER-37 y A-427 fueron crecidas en medio de cultivo RPMI-1640, y la línea celular HeLa fue crecida en medio de cultivo D-MEM. Ambos medios fueron suplementado con 10% de suero fetal bovino, 200 mM de L-glutamina y 100 mM de piruvato de sodio. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 5% de CO₂ y bajo una atmósfera húmeda.

Las células HeLa fueron utilizadas como control en varios experimentos ya que ellas fueron la fuente original para la clonación de los genes de topoisomerasa II (alfa y beta), así como los estudios de la actividad enzimática de estas enzimas.

Aislamiento de Plásmido

Bacterias *E. coli* K7 que contenían al plásmido pUC 19 fueron crecidas en medio Luria. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 20 min. El botón fue resuspendido en 10 ml de solución 1 que contenía 5 mg/ml de lisosima y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se le adicionaron 10 ml de solución 2 (ver apéndice) se homogeneizó suavemente y se incubó en hielo durante 10 min. Después se le adicionaron 7.5 ml de acetato de potasio 5 M frío, se mezcló suavemente y se colocó en hielo durante 10 min. A continuación se centrifugó la muestra a 14 000 rpm durante 30 min. a 4°C. Se recogió el sobrenadante y a este se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló y se dejó durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. El botón se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min. El botón se resuspendió en amortiguador TE. Se le adicionó 40 µg de RNAsa pancreática(GIBCO). El plásmido se cuantificó al tomar 1 µl de muestra y realizar una dilución 1:500 y tomar la lectura en un espectrofotómetro con luz UV a 260 nm. Después de obtener la lectura se siguió la siguiente relación:

1 unidad de Abs 260 = 1 unidad de D.O. 260 = 50 µg de ADN

Aislamiento de la Forma I de plásmido (Forma superenrollada del plásmido)

Las diferentes formas del plásmido se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1%. La forma I fue obtenida mediante un corte al gel y se colocó en tubos Eppendorf de 1 ml. Se le adicionaron 5 volúmenes de amortiguador TE y se incubaron a 65°C durante 5 min. Enseguida se le adicionó el mismo volumen de fenol pH 8.0. Se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm durante 10 min. Después se separó la fase acuosa y se le adicionó el mismo volumen de fenol-cloroformo, y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min. Nuevamente se obtuvo la fase acuosa y se le adicionó el mismo volumen de cloroformo, se centrifugó durante 10 min a 12 000 rpm. Se separó la fase acuosa y se le adicionó 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y

2 volúmenes de etanol a 4°C. Se centrifugó durante 10 min a 12 000 rpm, la pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador TE y se almacenó a 4°C.

Aislamiento de kADN

Extracción de ADN mediante la técnica de DNAzol (Gibco)

Se utilizaron aproximadamente $1-10 \times 10^6$ células, las cuales se lavaron con ASF y se mantuvieron en paquete. A este paquete celular se le adicionó 1 ml de DNAzol homogeneizando suavemente por inversión o por la acción de una punta de micropipeta recortada. Una vez obtenido el homogeneizado se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo. El ADN se precipitó al agregarle 500 μ l de etanol, mezclando por inversión suavemente y dejándolo incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se observó un precipitado blanco el cuál fue transferido cuidadosamente a otro tubo (para evitar rompimiento), en donde se realizó el lavado del ADN con 1 ml de etanol al 95% y centrifugando a 12 000 rpm durante 3 min. Después de los lavados se solubilizó el ADN en 200 μ l de hidróxido de sodio 8 mM, neutralizando la reacción con 8.4 μ l de HEPES 0.1 M. Tomando una alícuota de la solución anterior se realizó una dilución 1:500 y se prosiguió a la cuantificación de ADN, realizando la lectura en un espectrofotómetro con UV a 260 nm.

Extracción de ARN por la técnica de Trizol

Se utilizaron de 1×10^6 a 1×10^7 células a las cuales se les agregó 1 ml de Trizol, dejando incubar durante 5 min. a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se les adicionó 0.2 ml de cloroformo, mezclando vigorosamente y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min. a 4°C. Después de la centrifugación se separó la fase acuosa y se le adicionó 0.5 ml de isopropanol para precipitar el ARN. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 min. y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min. a 4°C. Cuando se obtuvo el botón se eliminó el sobrenadante por decantación

cuidadosa, lavándolo una vez con etanol al 75% durante 5 min. y secado cerca de la flama. El botón seco se disolvió en agua con dietilpirocarbonato (DEPC). Para su cuantificación se tomó una alícuota de 1 μ l, se diluyó en 500 μ l de agua y se cuantificó en el espectrofotómetro con luz UV a 260 nm obteniendo la siguiente relación:

1 unidad de Abs 260 = 1 unidad D.O. 260 = 40 μ g. de ARN

Análisis de RT-PCR

Síntesis de ADNc

Una vez obtenido el ARN por la técnica de Trizol se prosiguió a realizar el ADNc, colocando de 3-5 μ g de ARN con 0.5 μ g de oligo dT; H₂O-DEPC hasta llegar a obtener un volumen final de 12 μ l y se dejó incubando durante 10 min. a 70°C. Después de la incubación se colocó durante 1 min. a 4°C. Posteriormente se le adicionaron 4 μ l de Amortiguador de PCR 5X (GIBCO); 200 μ M dNTPs, 500 pM de cada oligonucleótido y 0.01 M de DTT incubando durante 2-5 min. a 42°C. Se agregó 1 μ l de Transcriptasa inversa (Superscript II RT, GIBCO) y se dejó incubando a 42°C durante 50 min. Para detener la reacción se incubó a 70°C durante 15 min y a 4°C durante 1 min. Una vez terminados los tiempos de incubación se le agregó RNasa H (2.5 U/ μ l) para degradar las cadenas de híbridos ARN-ADNc seguida de una incubación de 30 min. a 37°C y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la Polimerasa o PCR

Para realizar el PCR se colocaron 5 μ l de amortiguador de PCR 10X, 200 μ M de dNTPs, 500 pM de cada oligonucleótido, 1.5 - 2 mM de MgCl₂, 2.5 U de Taq polimerasa, 1 μ l de ADNc y en un volumen final de 50 μ l el cual se complementa con agua. A cada tubo se le agregó 50 μ l de aceite mineral y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Programed Therna Controller (Modelo PTC-100, MJ Research, Inc), durante 35 ciclos y las temperaturas de alineamiento especificadas en Cuadro I.

Los resultados se visualizaron en un gel de acrilamida al 4% en amortiguador de TBE, la tinción de las bandas de amplificación se realizó con bromuro de etidio y se observó en una lámpara de luz UV, obteniéndose una fotografía con una cámara Polaroid en película B/N.

Cuadro 1. Características y condiciones de amplificación de los genes estudiados por RT-PCR.

Nombre del gen	Secuencia de oligonucleótidos	Temp. de alineamiento (°C)	MgCl ₂ (mM)	Longitud (pb)
Topo II alfa 3'	5'-TTT AAG GCC CAA GTC CAG TTA AAC-3' 5'-GTA TAA CAA TAT CAT CAA GAT TGT-3'	63	1.0	343
Topo II alfa ATP	5'-TTT AAG GCC CAA GTC CAG TTA AAC-3' 5'-CAC AAT CTT GAT GAT ATT GTT AAT-3'	55	1.0	293
Topo II beta	5'-GAA GTG TTC ACT AGT AAA ATA CAG T-3' 5'-CAT AAT CTT TCC ATA GCG TAA GGT T-3'	60	1.0	336
GAPDH	5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA-3' 5'-GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA-3'	63	1.0	110
MRP	5'-TCT CTC CCG ACATGA CCG AGG - 3' 5'-CCA GGA ATA TGC CCC GAC TTC - 3'	60	1.5	140
MDR-1	5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG - 3' 5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA - 3'	60	1.0	150

Extracción de fracción nuclear.

Se tomaron de 2.5×10^6 células tumorales a partir de cajas de cultivo T25 por tripsinización; y se lavaron dos veces por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos en amortiguador ASF (solución salina de fosfatos). Al botón celular se le agregó 1 ml de amortiguador A; una vez resuspendido el botón se le agregaron 9 ml. de amortiguador A con 0.3% de tritón X-100, y la muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. El botón celular se lavó por centrifugación con 10 ml. de amortiguador A (ver apéndice). Con la finalidad de romper los núcleos, el botón se resuspendió en 0.5 ml. de amortiguador A y 0.5 ml. de amortiguador B (ver apéndice) y se dejó incubar durante

2 horas a 4°C. Después de la incubación la muestra se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el botón se resuspendió en 50 µl de amortiguador A y 50 µl de amortiguador B, esta solución se diluyó en 100 µl de glicerol al 87%, y la muestra fué almacenada a -20°C.

Extracto celular

Se tomaron de $2-5 \times 10^6$ células tumorales de cajas T₂₅ por medio de tripzinación, se lavaron 3 veces con ASF frío a 1500 rpm durante 10 minutos. El botón celular se resuspendió en 1 ml. de amortiguador C, y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Se llevó a cabo el lisado celular con la ayuda de un pistilo. Al lisado celular se le agregó 1 ml de amortiguador B y se homogeneizó la muestra. Se dejó incubar durante 2 horas a 4°C. La muestra se centrifugo a 12 000 rpm durante 20 min. Finalmente el botón celular se resuspendió en 50 µl de amortiguador C y 50 µl de amortiguador B, y esta solución se diluyó en 100 µl de glicerol al 87%. La muestra se almacenó a -20°C

Determinación protéica por la técnica de Lowry-Folin

La determinación de la concentración de proteína se realizó a través de la comparación con una curva patrón con albúmina sérica bovina (concentraciones de 2-10 µg); de la muestra tanto de fracción nuclear como de extracto total se tomaron alícuotas de 2 y 4 µl, las cuales reaccionaron de acuerdo a la técnica de Lowry. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 750 nm.

Una vez obtenida la cuantificación proteica de la fracción nuclear y extracto total de las líneas celulares utilizadas se realizó un ensayo de actividad enzimática.

Ensayo de Actividad Enzimática para Topoisomerasa II

La actividad enzimática de Topo II fué medida por el desenrollamiento de la FI del plásmido pUC 19 y la decatenación de λ ADN. Se realizó con proteínas tanto del extracto nuclear como del extracto total. Se colocó la proteína y se adicionaron 4 µl del

plásmido pUC 19 (5.5 µg/µl) en amortiguador de Tris 5x con ATP 1 µM en un volumen final de 25 µl dejando incubar a 37°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación para detener la reacción las muestras fueron colocadas en hielo y se les agregó 2.5 µl de proteinasa K (1mg/ml) y 2.5 µl de SDS al 10%. Para visualizar los resultados se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio para poder observar en luz UV. La actividad de Topo II de decatenación sobre kADN se realizó de la misma forma, sólo que se utilizaron 975 ng de kADN.

Inmunohistoquímica

Se sembraron 5×10^5 células en un portaobjetos durante 24 h y posteriormente se les retiró el medio y fueron fijadas por inmersión en etanol absoluto. A cada preparación se le adicionó 100 µl del primer anticuerpo anti Topo II alfa en una dilución de 1/1000, se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación se lavó tres veces con ASF. A continuación se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG/M de conejo conjugado con fosfatasa alcalina y se dejó incubar una vez más durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó un kit de revelado de BIOGENEX usando nueva fuchsina según indicaciones del fabricante después se montaron las placas en resina.

Inmunotransferencia o Western blot

Se purificaron preparaciones de extracto total o fracciones nucleares, tanto de las células control (HeLa) como de las células INER-37. Para cada uno de ellos se obtuvieron 40 µg de proteína total los cuales fueron resuspendidos en amortiguador de muestra en una dilución 1:2 y se hirvieron durante 3 minutos. Después se llevó a cabo la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% en amortiguador de corrimiento, durante 90 minutos a 90 Volts. La inmunotransferencia se realizó en una membrana de nitrocelulosa a 350 mA durante 2 horas. La membrana fue incubada durante 16 horas a

4°C con solución bloqueadora al 1% (Amersham). Enseguida la membrana se lavó tres veces con ASF-Tween (10 min). Se incubó la membrana con el primer anticuerpo anti Topo II (TOPOGEN) diluido 1:1000 en solución bloqueadora al 0.5% durante 1 hr. Después se lavó con ASF-Tween dos veces durante 10 min. Se adicionó el anticuerpo secundario POD-conjugado y se dejó incubar durante 30 min. La detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia (Amersham,UK) y se realizo la autorradiografía en película Kodak.

RESULTADOS

Al observar en la línea INER-37 que presentaba una resistencia incrementada a VP-16, se pensó que un problema pudiera ser que la falta de expresión del transcrito de topo II alfa o bien una expresión disminuida. Si una de estas dos posibilidades fuera correcta, era factible que la concentración de la enzima estuviera también disminuida, dando como resultado que el fármaco no tuviera sustrato para poder actuar o lo hiciera en menor grado.

Para determinar el grado de expresión del transcrito de Topo II alfa se realizó un estudio de RT-PCR, con oligos específicos para la región 3' del gen. Con estos oligos se esperaba amplificar un fragmento de 343 pb. Los resultados de RT-PCR mostraron que no solo se pudo amplificar un fragmento del tamaño esperado, sino que la intensidad de banda fue mayor en comparación a la amplificación obtenida con el control. (FIG 4). Este resultado mostró que INER-37 expresa una gran cantidad de transcrito de Topo II alfa, el cual probablemente puede ser traducido correctamente en enzima. Sin embargo, este hallazgo estuvo en contra de los resultados de resistencia a etopósido, ya que al haber mucho transcrito para Topo II alfa y probablemente la concentración de la proteína también lo fuera, la célula debería de ser muy susceptible.

Así mismo, también se analizó la expresión de otros genes involucrados en multiresistencia tales como MDR-1, MRP y Topoisomerasa II beta. Los resultados de RT-PCR mostraron que INER-37 no presentó transcritos para MDR-1, por lo que la actividad de esta proteína fue descartada como posible responsable de la resistencia. En tanto que sí se encontró expresión del gen de MRP y topo II beta. La presencia de MRP sin embargo no explicó la resistencia específica a etopósido y en cambio la expresión de Topo II beta al igual que la topo II alfa podrían producir un fenotipo de sensibilidad.

Al analizar la región del gen de Topo II alfa correspondiente a la región que codifica para el dominio de unión a ATP, se obtuvo el fragmento esperado (293 pb) indicando la presencia del mismo, no así la existencia de alguna mutación importante.

Con la finalidad de analizar la calidad del producto del gen de topo II alfa producido por INER-37, se realizaron ensayos de actividad enzimática a partir de las fracción nucleares y extractos totales (material y métodos).

Se utilizaron 3 µg de proteína total de fracción nuclear de las células INER-37 y se compararon con los de las células HeLa. Cabe mencionar que en este tipo de ensayos no es posible diferenciar la actividad de las dos isoformas, alfa y beta, sino que la actividad que se observa es la suma de ambas.

Los resultados mostraron que una concentración de 3 µg el extracto nuclear de INER-37 (FIG. 5, carril 5) no fue capaz de desenrollar la forma I del plásmido (PUC-19), mientras que el extracto de HeLa a la misma concentración de proteína, sí llevó a cabo el desenrollamiento del plásmido (FIG. 5, carril 2).

Estos resultados indicaron que había una disminución o falta de actividad de Topo II en los núcleos de INER-37 en comparación a los de HeLa. Para demostrar hasta que punto estaba afectada la actividad de topo II alfa en el núcleo de células INER-37, se realizó otro ensayo de actividad enzimática utilizando varias concentraciones de proteína nuclear de INER-37 comparándola con las células HeLa. Se utilizaron distintas concentraciones de proteína nuclear de 0.5 µg a 5.0 µg y se midió su actividad sobre la forma I del plásmido. Se observó que la actividad de Topo II en INER-37 fue muy baja ya que el paso de la forma I a la forma II del plásmido fue mínima y solo en las concentraciones más elevadas (4.5 a 5.5 µg) fue posible encontrar actividad enzimática (FIG. 6, carriles 10-12). Por el contrario, los extractos nucleares de HeLa presentaron actividad enzimática desde la primera concentración (0.5 µg) (FIG. 6).

Debido a que la actividad enzimática de topo II alfa en INER-37 no parece residir completamente en la fracción nuclear, se llevaron a cabo estudios de actividad en extractos celulares totales para probar si la actividad enzimática se encontraba

disminuida o bien estaba presente en otro compartimento celular.

Los resultados indicaron que a una concentración de 3 μg de proteína total de INER-37 había actividad enzimática de topo II (FIG. 7), ya que se observaron formas intermedias de las formas I y II del plásmido y conforme aumentó la concentración de proteína se observó una desaparición de la forma I. En los extractos totales de HeLa se encontró un patrón similar (FIG. 7).

Con la finalidad de comprobar la existencia de actividad enzimática de topo II en los extractos totales de INER-37 se llevaron a cabo experimentos para determinar la actividad enzimática utilizando como sustrato un kADN. La actividad de topo II es mayor y mas específica cuando se utiliza kADN en comparación al uso de plasmidos.

Para este experimento se utilizaron distintas concentraciones de proteína desde 1 μg hasta 6 μg . Una vez mas, los resultados fueron parecidos a los encontrados con el uso de plásmido, ya que la actividad de topo II que decatena el kADN se presentó desde las concentraciones más bajas de proteína. De la misma manera los extractos de células HeLa, presentaron una actividad de decatenación desde 1 μg de proteína (FIG. 8).

El desenrollamiento del plásmido o la decatenación sobre la molécula de kDNA son actividades realizadas primordialmente por las topoisomerasas de tipo II, cuando en la reacción esta presente ATP y Mg^{+2} . Sin embargo, en ausencia de ATP, esta actividad pudiera en parte ser realizada por la topoisomerasa I. Con el fin de comprobar que la actividad de decatenación encontrada en los extractos celulares era debida a Topo II, se realizó un ensayo de inhibición con VP-16 a diferentes concentraciones desde 8 μM hasta 120 μM . Estos experimentos mostraron un inhibición de la actividad de Topo II a partir de una concentración de 35 μM de VP-16 en extractos nucleares de HeLa (FIG. 9). Esto nos indicó que efectivamente Topo II era la responsable de las actividades sobre el sustrato. De la misma manera se inhibió la actividad catalítica en extractos totales de INER-37 con diferentes concentraciones de VP-16, encontrándose inhibición de la actividad de la enzima, comprobándose que Topo II era responsable del

desenrollamiento del plásmido (**FIG. 10**).

A pesar de que INER-37 produce una gran cantidad de transcrito para Topo II alfa y se transcribe correctamente, dando una actividad enzimática eficiente, esta no pudo ser encontrada en la fracción nuclear y sí en la célula completa. Estas evidencias sugirieron que la localización de la enzima debería de residir en un compartimento celular distinto al núcleo.

Para localizar el sitio de compartimentalización de Topo II en INER-37 se llevaron a cabo estudios de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos para la isoforma alfa. Las imágenes mostraron que la Topo II alfa se encontró primordialmente en el citoplasma (**FIG. 11 c,d**). Además, no presentó una distribución homogénea en todo el citoplasma, sino que se localizó en su mayoría alrededor del núcleo y de una forma reticular. Se observó un gradiente presentando una mayor concentración cerca del núcleo y conforme se aleja de este disminuye hasta el perímetro de la membrana plasmática, en algunas de las células se observó una pequeña tinción dentro del núcleo, indicándonos una concentración pequeña de la enzima en núcleo. Algunas otras presentaron una tinción completa, estas células se encontraban en fase de mitosis y por esta razón se observaron totalmente teñidas.

En el caso de las células HeLa utilizadas como control, la enzima fue localizada en el núcleo (**FIG. 11a,b**). Se observó una tinción homogénea de los núcleos, no se presentó ninguna célula con tinción en el citoplasma que nos indicara la presencia de la enzima fuera de núcleo.

Estos resultados indicaron que en las células INER-37, la localización de la topoisomerasa II alfa fue primordialmente en el citoplasma y solo una poca de ella se localiza en el núcleo.

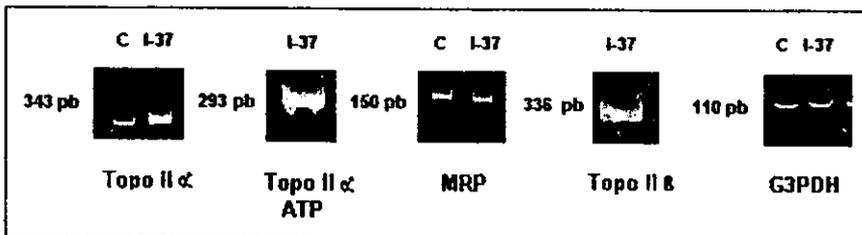


FIG. 4 Expresión de genes de multiresistencia en INER-37. Mediante un estudio de RT-PCR se determinó la expresión de genes relacionados en la resistencia a fármacos tales como Topo II α (3' y dominio de unión a ATP), Topo II β y MRP. El gen constitutivo G3PDH fue utilizado como control de expresión. C: control positivo; I-37: INER-37.

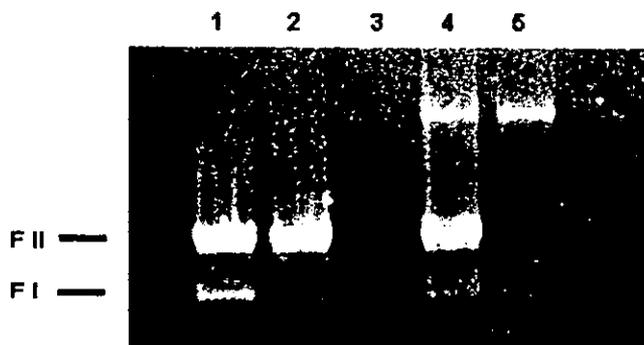


FIG. 5. Actividad enzimática de Topoisomerasa II en fracciones nucleares de células HeLa e INER-37. Tres microgramos de proteína nuclear se incubaron a 37°C durante 30 min. con 5 µg de pUC-19. Carriles: 1, control negativo (pUC-19); 2 y 4, fracciones nucleares de células HeLa ó INER-37 con pUC-19; 3 y 5 solo fracción nuclear de las mismas células. F I: forma superenrollada; F II: forma relajada.

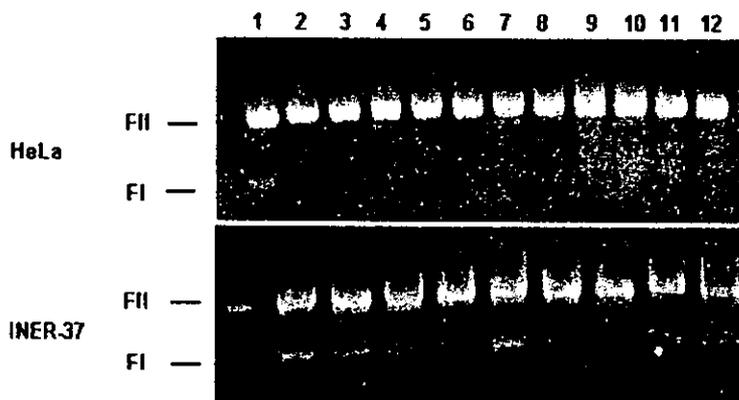


FIG. 6. Actividad enzimática de Topoisomerasa II en fracciones nucleares de células HeLa e INER-37. Concentraciones crecientes de proteína nuclear fueron incubadas a 37°C durante 30 min. con 5 µg de pUC-19. Carriles: 1, control negativo (pUC-19); 2-12, proteína nuclear en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5 µg respectivamente, para cada una de las líneas celulares. FII forma superenrollada del plásmido; FI: forma relajada.

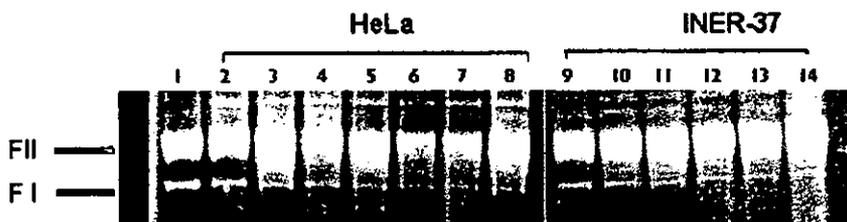


FIG. 7. Actividad enzimática de Topoisomerasa II en extractos totales de células HeLa e INER-37. Concentraciones crecientes de proteína total fueron incubadas a 37°C durante 30 min. con 5 µg de pUC-19. Carriles: 1, control negativo (pUC-19); 2-8, proteína total de células HeLa en concentraciones de 1-7 µg; 9-14, proteína total de células INER-37 en concentraciones de 1-6 µg. FI: forma superenrollada; FII: forma relajada.

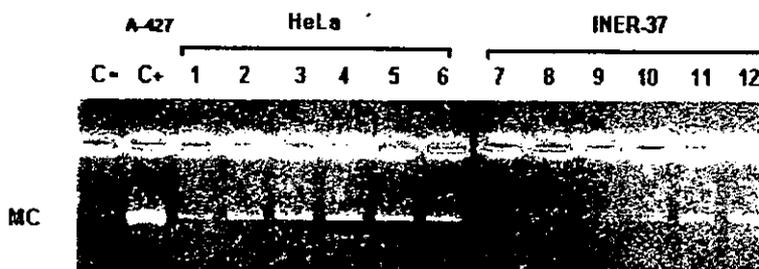


FIG. 8. Actividad enzimática de Topoisomerasa II en extractos totales de células HeLa e INER-37 sobre kADN. Distintas concentraciones de proteína fueron incubadas a 37°C durante 30 min. con 0.975 µg de kADN. Carriles: C-, control negativo (kADN); C+, control positivo (1µg de proteína total de células A-427); carriles 1-6 y 7-12, extractos totales de células HeLa e INER-37 en concentraciones de 1 a 6 µg respectivamente. MC, minicírculos de kADN.

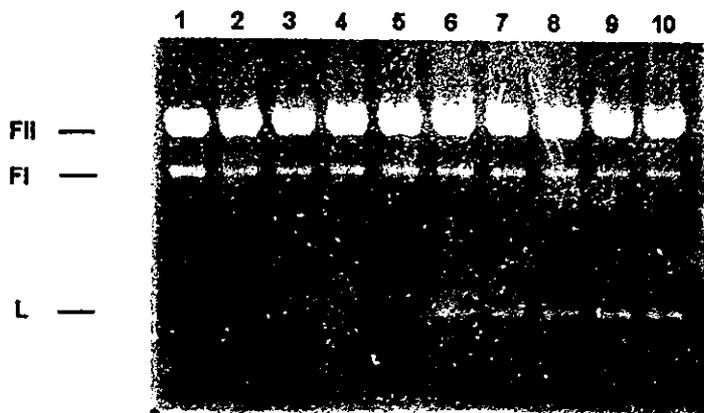


FIG. 9. Inhibición de la actividad enzimática de Topoisomerasa II por VP-16 en la fracción nuclear de células HeLa. Dos microgramos de proteína nuclear fueron incubados a 37°C durante 30 min. con 5 μ g de plásmido y concentraciones crecientes de VP-16. Carriles: 1, control negativo (pUC-19); 2, control positivo (proteína nuclear+pUC-19); 3-10, VP-16 a concentraciones de 8, 16, 25, 35, 45, 50, 100 y 120 μ M respectivamente. Ft: forma superenrollada; Ft: forma relajada; L: forma linealizada.

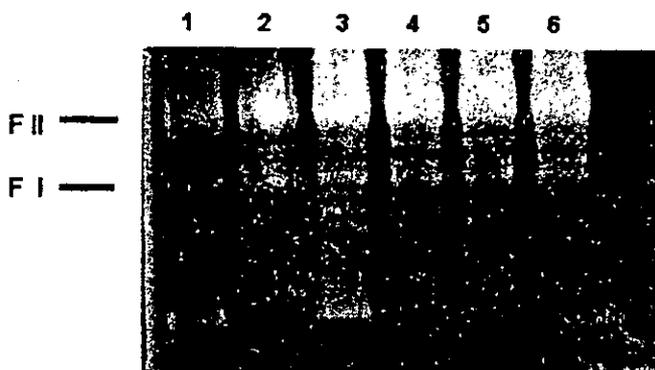


FIG. 10 Inhibición por VP-16 de la actividad enzimática de Topoisomerasa II en extractos totales de INER-37. A 4 μg de proteína total se le adicionó 5 μg de plásmido (pUC-19) y concentraciones crecientes de VP-16. Carriles: 1, plásmido; 2, extracto total y plásmido; 3-6, igual que en carril 2, más VP-16 en concentraciones de 8, 25, 50 y 100 μM respectivamente.

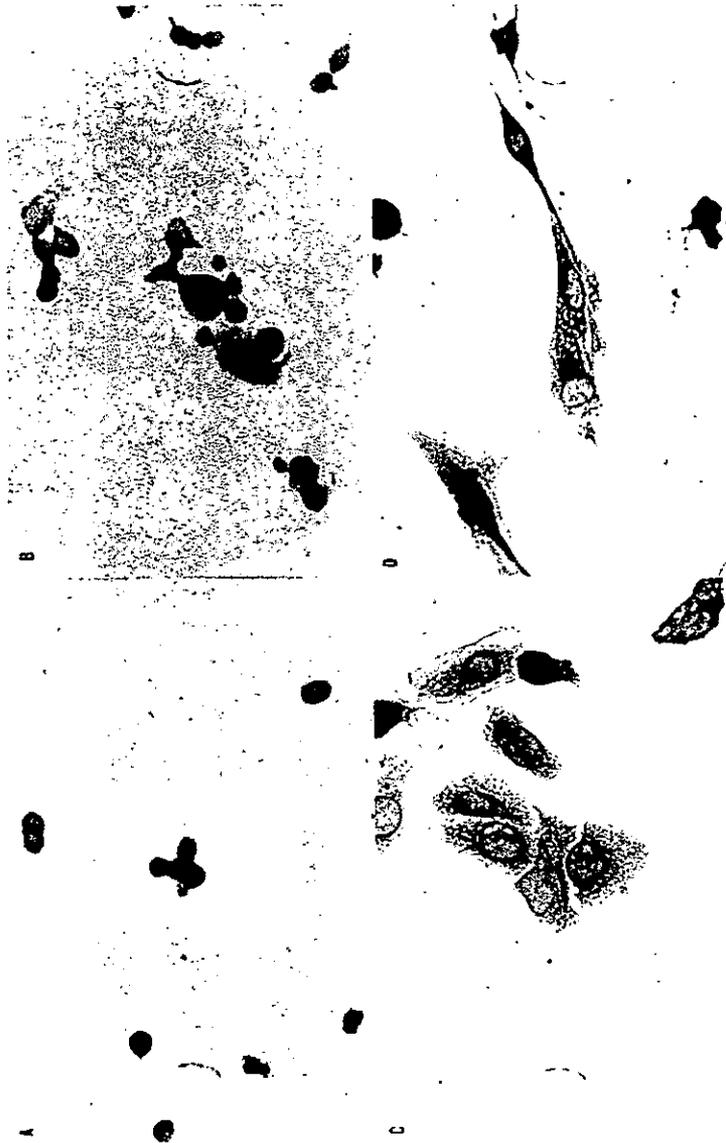


FIG. 11 Inmunohistoquímica contra Topoisomerasa II alfa. En A y B se observa una distribución nuclear de Topo II alfa en células HeLa, utilizadas como control. En C y D, la localización de la enzima en las células INER-37 se distribuye preferentemente en la región citoplasmática.

DISCUSION

Las células INER-37 corresponden a una línea de adenocarcinoma y fueron obtenidas a partir de un derrame pleural de un paciente con cáncer pulmonar virgen al tratamiento de quimioterapia. Esta línea celular fue mantenida bajo condiciones de cultivo *in vitro* por varios pasajes y no fue seleccionada con ningún medio selectivo.

Los primeros estudios de sensibilidad a fármacos mostraron una resistencia incrementada a etopósido, aproximadamente 6 veces mayor con respecto a la línea celular A-427. Esto indicó que podía existir algún problema en las Topoisomerasas de tipo II, dada la especificidad del etopósido por estas enzimas. Al realizarse estudios de RT-PCR, actividad enzimática e inmunohistoquímica, los resultados indicaron que la topoisomerasa II alfa tiene una localización primordialmente citoplasmática, sugiriendo que esta fue la causa de la resistencia incrementada a etopósido.

Para la identificación de Topo II alfa mediante RT-PCR se diseñaron un par de oligonucleótidos complementarios a la región 3' del gen (según la secuencia reportada por Tsai-Pflugfelder M y cols.)(61). Esta selección fue importante debido a la alta similitud que existe entre las dos formas de las topoisomerasas de tipo II (alfa y beta) ya que en esta región la similitud entre ellas es muy baja. La obtención de un fragmento de 343 pb en el RT-PCR sugirió que el gen era transcrito en su mayor parte y no se pensó en alteraciones mayores. En otros experimentos también se amplificó un segmento de 293 pb correspondiente a la región que codifica para el dominio de unión a ATP. No obstante, a pesar de que se lograron amplificar correctamente los dos segmentos del transcrito de topo II alfa, con estos resultados no fue posible asegurar que el ARNm de topo II alfa tuviera el tamaño adecuado de 6.4 kb. Por lo que tampoco fue posible asegurar si el gen haya sufrido alguna delección o si existen mutaciones que pudieran alterar la función de la enzima. Cabe señalar que otra región importante del gen es la que codifica para el dominio de unión a ADN, la cual no fué estudiada, por lo que se desconoce si esta región tan importante para la actividad catalítica de la enzima se encuentra alterada. Debido a que los sitios que delimitan las regiones de

amplificación para la PCR (extremo 3' y dominio para el ATP) se encontraban alejados en la secuencia de ADNc por aproximadamente 1.8 kb y a que se encontró amplificación para ambos, es probable que cuando menos uno de los alelos no presente grandes alteraciones (p.ejem. inserciones o mutaciones) que afecten el producto y su función. Si uno de los alelos presentara una delección en este segmento, es probable que no se amplifique por la RT-PCR, por lo que los resultados solo reflejaran la actividad del alelo "normal". Además, la presencia de mutaciones puntuales no fue posible descartarla.

Las mutaciones descritas en Topo II alfa han sido relacionadas con una deficiente actividad catalítica de la enzima, y todas ellas corresponden a mutaciones puntuales e involucran la sustitución de un aminoácido por otro. Estas mutaciones se encontraron en líneas celulares tanto de hamster, como de humano (HL-60/AMSA y CEM/VM-1), mismas que fueron seleccionadas para algún fármaco. De modo que hasta la fecha no se han descrito mutaciones que alteren la localización celular de la enzima. Sin embargo, este fenómeno no puede ser descartado para las células INER-37, y es posible que alguna mutación puntual, afecte la localización de la enzima.

El gen de Topo II beta también fué analizado y se obtuvo el fragmento deseado para este gen (336 pb), de modo que Topo II beta también puede ser expresada por INER-37.

El análisis de la expresión para otros genes relacionados con la resistencia mediante RT-PCR mostró la presencia de transcrito para MRP, pero para MDR-1. Con este resultado se descartó la actividad del producto de MDR-1 (gp-P) como responsable de la resistencia a etopósido, sin embargo, debido a la presencia de ARNm para MRP y probablemente su producto, se esperaría una resistencia no sólo a etopósido, sino también a otros fármacos como doxorubicina (DXR), CPT, 5-Flu, Ara-C, MTX, etc, misma que no fue observada. Es en este sentido, que se desconoce cual es el papel que desempeña MRP en las células INER-37 y porque sólo se observó resistencia a un sólo fármaco.

Los ensayos de actividad enzimática en INER-37 dieron una mayor evidencia de que Topo II alfa era traducida eficientemente. El análisis de los extractos nucleares de estas células mostraron que la actividad de Topo II en este compartimento era baja. Sin embargo, esta actividad si fue encontrada en las células completas (extracto total). El hecho de que INER-37 presente una actividad de Topo II citoplásmica y de acuerdo con los resultados de inmunohistoquímica permite suponer que: la actividad catalítica de Topo II se encuentra poco alterada y que el sitio de unión a ADN no presenta alteraciones por lo que la Topo II alfa actúa eficientemente con su sustrato a través de la hidrólisis de ATP.

Además, los ensayos de inhibición mostraron que efectivamente Topo II fué responsable del desenrollamiento de pUC y la decatenación de kDNA. Así mismo, estos resultados sugirieron que los sitios de unión a etopósido también se encontraban presentes, descartando así la posibilidad de que no existieran o que estuvieran alterados, dando como resultado que el etopósido fuera incapaz de unirse a la enzima e inhibir su actividad.

Cabe señalar que la mayoría de los estudios de inhibición con VP-16 refieren la actividad de este compuesto sobre la isoforma alfa, pero la actividad sobre la isoforma beta no ha sido completamente estudiada. Es en este sentido que en los ensayos de inhibición con VP-16 se asocian preferentemente a la Topo II alfa, pero dado que INER-37 expreso un mensajero de Topo II beta y por las características del ensayo no fue posible descartar completamente el papel de Topo II beta en la resistencia a etopósido. Además, en los ensayos de actividad enzimática para extractos nucleares se observó una pequeña actividad de Topo II, que puede ser atribuída a Topo II beta.

El estudio de inmunohistoquímica definió correctamente la localización de Topo II alfa, ya que se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo específicos para Topo II alfa humana, mismos que no reconocen la isoforma beta. Este ensayo indicó que la mayor parte de Topo II alfa se encontró en citoplasma y una pequeña concentración en núcleo. En este último caso, la localización de la Topo II alfa parece ser debida a una

redistribución de la enzima al entrar la célula a mitosis y depolarizarse la membrana nuclear.

La resistencia incrementada a etopósido en INER-37 puede ser explicada por la localización de Topo II alfa en citoplasma, ya que aunque el fármaco pueda unirse a la enzima esta no está unida a ADN, por lo tanto no se presentará un rompimiento de la cadena por la formación del complejo fármaco-enzima-ADN. No obstante, el papel de la Topo II beta aún no está bien definido, ya que en este momento se descartó, con lo que es necesario realizar mas ensayos específicos para esta enzima y de esta forma poder conocer su papel en la resistencia de estas células, ya que ambas isoformas han sido relacionadas con la resistencia a fármacos, tanto en levaduras como en líneas celulares (75,76).

La Topo II alfa es dependiente de ciclo celular. Esta enzima aumenta su concentración en la fase de síntesis y en G₂/M, ya que es importante para la duplicación y la segregación de los cromosomas. La Topo II beta por el contrario, tiene una concentración casi constante a lo largo del ciclo celular. Aunado a las diferencias de expresión existentes entre ambos tipos de isomerasas, la localización en la célula es también diferente. La Topo II alfa se localiza durante todo el ciclo celular en núcleo y asociada a los centriolos, mientras que la Topo II beta durante la mitosis se mantiene un 70% de la proteína en citoplasma y un 30% en núcleo (77).

En INER-37 se realizó un estudio de ciclo celular que mostró que un mayor porcentaje de las células radican en la fase G₂ y mitosis en comparación a células HeLa (INER-37: G₁(54%), S(26%), G₂/M(20%); HeLa: G₁(56%), S(32%), G₂/M(12)), lo cual explica la alta expresión encontrada por los experimentos de RT-PCR (comunicación directa con Dr. Raúl Barrera).

Sin embargo, Topo II alfa se encontró primordialmente en el citoplasma, por lo que se desconoce quien lleva a cabo la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Para explicar esto se sugirieron dos alternativas: la primera es que tan solo una

pequeña concentración de Topo II alfa en núcleo sea suficiente para llevar a cabo la segregación de los cromosomas, o bien que esta concentración no sea suficiente y que la deficiencia sea compensada por la actividad de topo II beta.

Uno de los eventos que se presenta frecuentemente en los tumores, es la pérdida de la heterocigocidad de algunos genes o regiones del genoma. Esto se da por la pérdida de alguna de las regiones de los cromosomas, y con esto también se da la pérdida de alguno de los alelos de varios genes, de tal forma que puede permanecer en la célula el alelo mutado y de esta forma perder al alelo normal. Los cambios más comunes encontrados tanto en células pequeñas como en células no pequeñas de cáncer de pulmón, son la pérdida de material genético en el brazo pequeño del cromosoma 3, que involucra por lo menos tres regiones distintas localizadas en 3p25, 3p21.3 y 3p14-cen. A pesar de que desconocemos si existen alteraciones de este tipo en INER-37, estas células pudieron sufrir la pérdida (o mutación) de uno de los alelos de Topo II alfa y así tener únicamente un alelo . Esto lo sugiere el hecho de que el 100% de la enzima fue localizada en el citoplasma y si ambos alelos se encontraran presentes en la célula, al menos el producto de uno de ellos debería de encontrarse en núcleo. Otra alternativa es que los dos alelos de Topo II alfa en INER-37 se encontraran mutados, y sus productos tuvieran una localización preferentemente citoplásmica.

La resistencia a fármacos mediada por la alteración en la localización subcelular de la Topo II fué una proposición que durante varios años se especuló, y fué hasta 1995 que Cole y cols. reportaron la línea H209/V6 (células pequeñas) que había sido seleccionada para etopósido contenía una Topoisomerasa II de 160 kDa que estaba localizada en el citoplasma (71). La deleción de un fragmento en uno de los alelos y una mutación que detiene el marco de lectura en el otro alelo dieron como resultado estas enzimas. La pérdida de 10 kDa confería a la enzima la compartimentalización citoplásmica. La región faltante correspondía al carboxilo terminal de la enzima, y en ella se localizan señales de localización nuclear (73)

Existe otra Topo II alfa mutante con un carboxilo terminal truncado, que se reportó en la línea HL60/MX2 una leucemia humana seleccionada para mitoxantrona. Sin embargo, en contraste a la línea H209/V6, las células HL60/MX2 contiene una proteína nuclear normal de 170 kDa además de la mutante citoplasmática de 160 kDa. (75). Estas dos líneas celulares parecían presentar una misma delección en uno de los alelos para Topo II alfa, ya que los tamaños de los ARNm eran los mismos, 4.8 kb, pero estudios posteriores sugirieron que las alteraciones genéticas eran diferentes en las dos líneas (75). Sin embargo, el hecho de que las dos líneas, tanto H209/V6 y HL60/MX2 hayan adquirido resistencia por la producción de una Topo II alfa localizada en citoplasma sugiere que la resistencia por este mecanismo es resultado de la exposición a varios fármacos que tienen como blanco esta enzima (78). Las células INER-37 no fueron expuestas a ningún fármaco, y fueron cultivadas a partir de un derrame pleural de un paciente, por lo que presentaron resistencia *de novo*, no adquirida. Las posibles alteraciones que presente la Topo II alfa son intrínsecas del tumor, y no fueron inducidas. Para conocer el tamaño de la proteína se realizaron inmunotransferencias, sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios (FIG.12). INER-37 puede presentar una proteína truncada, que no presente las señales de localización nuclear y por lo tanto no transloque a núcleo. Estas secuencias se localizan entre los residuos 1454 (Lys) y 1497 (Glu) (79) . En esta secuencia se encuentran dos dominios de aminoácidos básicos, mismos que al ser mutados o bien deletados, la proteína presenta una localización predominantemente citoplasmática. Si estas señales no se encontrarán en la proteína, esta no podría ser transportada al núcleo, como en la línea H209/V6.

La observación de que la Topo II alfa mutante de la línea celular H209/V6 de 160 kDa presentó una actividad catalítica similar a la de la proteína normal de 170 kDa, indicó que la región del carboxi-terminal no parece tener un papel importante en la función catalítica de la enzima (71). Sin embargo se ha sugerido que la región del carboxilo sufre también de modificaciones post-traduccionales (80). Un estudio mostró que el sitio de mayor fosforilación en la Topo II alfa de humano se localiza en la posición 1524 correspondiente a una serina que se encuentra en el extremo terminal del carboxilo (81). En la proteína de 160 kDa de la línea H209-V6 este sitio no se

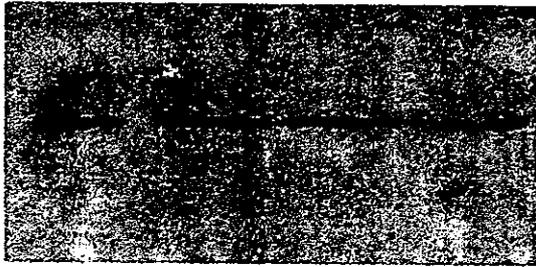


FIG. 12 Inmunoelectrotransferencia de fracción nuclear de células HeLa
Utilizando anticuerpos anti-Topoisomerasa II alfa.

encuentra y se ha mostrado que las secuencias de localización nuclear pueden ser reguladas por fosforilación. En INER-37 cabe la posibilidad de que este sitio de fosforilación puede encontrarse alterado o bien ausente en la proteína, de tal forma que los niveles de fosforilación estén reducidos provocando que la localización de la proteína en el núcleo sea ineficiente.

La localización citoplasmática de Topo II alfa en INER-37 explica porque la célula es resistente a formar los complejos ternarios ADN-enzima-fármaco. De esta forma la célula no ve afectada la integridad de su ADN, ya que la poca enzima que puede estar localizada en el núcleo y formar estos complejos no es suficiente para provocar la muerte de las células, por lo que los mecanismos de reparación pueden corregir este daño y permitir a la célula continuar viviendo.

Este mecanismo de resistencia no parece ser generalizado, sin embargo no podemos descartar que se presente en otras células o tumores de pulmón.

Sólo H209/V6 e INER-37 se han reportado que presenten este mecanismo, pero en INER-37 el hecho de que sea una línea "virgen" en cuanto a tratamiento con fármacos nos sugiere que este fenómeno se puede presentar en un tumor de manera natural. Sin embargo H209/V6 también nos muestra que al ser expuesta a una presión de selección (etopósido), se puede seleccionar una célula capaz de sobrevivir en presencia de fármaco y derivar en un tumor resistente, a través de la localización alterada de la Topo II.

INER-37 es un modelo que puede aportar mucho al conocimiento de la resistencia en tumores de pulmón, ya que tiene la ventaja de no ser una línea que ha sido modificada por la presencia de fármacos. Además esta línea al igual que otras líneas, muestra un poco la naturaleza del tumor del que se derivó. Presenta una gran variedad de características genéticas y fisiológicas que pueden ser estudiadas.

En INER-37 falta mucho por estudiar, en primer lugar se necesita un estudio a fondo de Topo II alfa, secuenciar su gen para poder conocer si existe alguna mutación o deleción, así como analizar los dos alelos del gen. También se necesita hacer un estudio de los transcritos de la Topo II alfa, ya que estudios preliminares sugieren que existen dos especies de ARNm para Topo II alfa (comunicación directa con Q.F.B. Ma. Cristina Negrete). Estudios para conocer a fondo la proteína, es decir, análisis que permitan conocer las secuencias de localización nuclear, así como sus niveles de fosforilación y la importancia de estos en la localización de la enzima. Definir el papel que tiene la Topo II beta en la resistencia a etopósido. Por otro lado las células INER-37 pueden ser utilizadas como modelo para estudiar el papel de MRP y GST μ en la resistencia múltiple, ya que MRP es expresado al igual que GST μ , sin embargo no parecen tener un papel importante en la resistencia de estas células.

Todo esto contribuirá a un mayor conocimiento del cáncer de pulmón y la resistencia a fármacos que presentan, de tal forma que se puedan desarrollar esquemas más efectivos para el tratamiento de estos tumores.

CONCLUSION

La Topoisomerasa II alfa presenta una localización citoplasmática en las células INER-37, misma que confiere a las células una resistencia a etopósido.

Referencias

1. Howard CM, Giordano A. Neoplastic Transformation: Oncogenes, Tumor Suppressors, Cyclins, and Cyclin-Dependent Kinases. 3 pp En Vedeckis W.V. 1996. Hormones and Cancer. Boston Ed., Birkhauser
2. Barrera R. y De La Garza G. En Patología Oncológica. Flores Flores G. Editado por McGraw-Hill Interamericana 1997. 1a. Ed.
3. Samet JM. The Epidmiology of Lung Cancer. Chest 1993; 103;205-295.
4. Onton RC, Brown RW, Mamoun Younes, Gondo MM, Stephenson MA y Cagle PT Human Pathology. Abscence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in NSCLC; Analysis of 427 cases. 1997; 28: 1079-1082.
5. Parker SH, Tong T, Bolden, et al. Cancer Statistics, 1996. CA, Cancer J CLIN 1996; 46: 5-27.
6. Mortalidad 1996. Dirección General de Estadística e Informática. Secretaria de Salud 1997.
7. Medina FM, Barrera RR, Morales JF, Echegoyen RC, Chavarria JG, Rebora FT. Primary Lung Cancer in Mexico City: a report of 1019 cases, 1996. Lung Cancer 1996; 14: 185-193
8. Doos L, Davis S, Pollisar L. 1986. A population-bases study of lung cancer incidence trends by histologic type, 1974-1981. J Natl Cancer Inst 1986; 76:21-29
9. Yesner R, Carter D. Pathology of carcinoma: changin patterns. Clin Chest Med 1982; 3:257-290.

10. Morabia A, Wynder EL. Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer*, 1991; 68: 2074-2078.
11. Yang CP, Gallager RP, Weis NS, Band PR, Thomas DB, Russell DA. Differences in incidence rates of cancers in the respiratory tract by anatomic subsite and histologic type. An etiologic implication. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1823-1831.
12. Jett JR. Current treatment of unresectable lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 603-611.
13. Murren JR, Buzaid AC. Chemotherapy and radiation for the treatment of non-small-cell lung cancer. A critical review. *Clin Chest Med* 1993; 14:161-171.
14. Chabner BA, Fine RL, Allegra CS, Yeh GW, Curt GA. Cancer chemotherapy: progress and expectations. *Cancer* 1984; 54: 2599-2608.
15. Lizano M. y Barrera R.1993. Resistencia múltiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cáncer. *Rev Invest Clin* 1993; 45; 481.492.
16. Bellamy TW. Multidrug resistance in human tumors. *Curren Opinion Oncol* 1990; 2: 1126-1132.
17. Beck WT. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 2879-2887.
18. Roninson IB. Molecular mechanism of multidrug resistance in tumor cells. *Clin Physiol Bioche* 1987; 5:140-151.
19. Gill DR, Hyde SC, Higgins CF, Valverde MA, Mintening GM, Sepulveda FV. Separation of drug transport and chloride channer functions of human multidrug resistance P- glycoprotein. *Cell* 1992; 71:23-32.

20. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Aca Sc USA* 1987; 84: 265-269.
21. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan Y, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7734-7738.
22. Willingham MC, Richert NC, Cornwell MM, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, et al. Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug resistant human cells. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 1451-1456.
23. Clynes M. 1994. *Multiple Drug Resistance in Cancer*. 1st. ed. Kluwer Academic Publishers. pp. 391
24. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323: 466-483.
25. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455:152-162.
26. Gross P, Neriah YB, Croop JM, Housman DF. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; 323:728-731.
27. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan Y.. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3004-3008.
28. Cole SPC. *Multidrug Resistance in Human Lung Cancer and Topoisomerase II*. *En Lung Cancer. Principles and Practice*. Pass H Y, Mitchel JB, Johnson DH, Turrisi AT. Editado por Lippincott-Raven Publishers, New York 1996. 1a. Ed.

29. Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986; 47: 371-380.
30. Cole SPC. Rapid Chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;17:259-263.
31. Cole SPC, Bhardway G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258:1650-1654.
32. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SPC, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 1994; 54:357-361.
33. Cole SPC. Drug resistance and lung cancer. In Wood J. *Cancer: concept to clinic*. Fairfax, N.J.: Medical Publishing Enterprises, 1992:15. 1st Ed.
34. Cole SPC, Chanda ER, Dicke FP, Gerlach JH, Mirski SEL. Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell lines: evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. *Cancer Res* 1991; 51:3345-3352.
35. Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SPC, Deeley RG. Characterization of the 190 kDa multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. *Cancer Res* 1995; 55:102-110.
36. Ketterer B, Harris JM, Talaska G. et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992; 98:87-94.

37. Tsuchida S, Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992; 27:337-384
38. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL et al. The glutathione S-transferase m polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2313-2318.
39. Carmichael J, Forrester LM, Lewis AD et al. 1988. Glutathione S-transferase isoenzymes and glutathione peroxidase activity in normal and tumour samples from human lung. *Carcinogenesis* 1988; 9: 1617-1621.
40. Di Ilio C., Del Boccio G., Aceto A et al. 1988. Elevation of glutathione transferase activity in human lung tumor. *Carcinogenesis* 1988; 9: 335-340.
41. Moscow JA, Dixon KH. Glutathione-related enzymes. Glutathione and multidrug resistance. *Cytotechnology* 1993; 12: 155-170.
42. Nakagawa K, Yokota J, Wada M et al. Levels of glutathione S transferase pi mRNA in human lung cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 301-304.
43. Cole SP, Downes HF, Mirski SE et al. 1990. Alterations in glutathione and glutathione-related enzymes in a multidrug-resistant small cell lung cancer cell line. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 192-197.
44. Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Katki AG, Myers CE, Cowan KH Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 15544-15549.

45. Cowan KH, Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Myers CE. 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* 1986; 83: 9328-9332.
46. Wolf CR, Macpherson JS, Smyth JF. Evidence for the metabolism of mitoxantrone by microsomal glutathione transferases and 3-methylcholanthrene-inducible glucuronosyl transferases. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 1577-1581.
47. Ciaccio PJ, Tew KD, LaCreta FP. The spontaneous and glutathione S-transferase-mediated reaction of clorambucil with glutathione. *Cancer Commun* 1990; 2: 279-285.
48. Meyers PJ, Gilmore KS, Harris JM, Hartley JA, Ketterer B. Chlorambucil/monogluthionyl conjugate is sequestered by human alpha class glutathione S-transferases. *Br J. Cancer* 1992; 66: 433-438.
49. Dulik DM, Fenselau C, Hilton J. Characterization of melphalan-glutathione adducts whose formation is catalyzed by glutathione transferases. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3405-3409.
50. Ketterer B, Meyer DJ, Clark AG. Soluble glutathione transferase isozymes. En Ketterer B, Seis H. (eds). *Glutathione Conjugation: Mechanism and Biological Significance*, London, Academic Press. pp 74-137.
51. Fairchild CR, Moscow JA, O'Brien EE, Cowan KH. Multidrug resistance in cells transfected with human genes encoding a variant P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 801-809.
52. Wang JC. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* 1971; 55: 523-533.

53. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M, Nash H. DNA gyrase : an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3872-3876.
54. Clarke DJ, Johnson RT, Downes CS. Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *J Cell Sci* 1993; 105:563-569.
55. Adachi Y, Luke M, Laemmli UK. Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation *Cell* 1991; 64:137-148.
56. Austin CA, Sng J-H, Patel S, Fisher LM. Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1172:283-291.
57. Jenkins JR, Ayton P, Jones T et al. Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:5587-5592.
58. Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1983; 258: 15365-15370.
59. Tsai-Pflugfelder M, Liu LF, Liu AA et al. Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:7177-7181.
60. Austin CA, Barot HA, Margerrison EEC et al. Structure and partial amino acid sequence of calf thymus DNA topoisomerase II; comparison with other type II enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:763-768.

61. Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST, Mirabelli CK. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 1989; 28:8154-8160.
62. Kimura K, Saijo J, Ui M, Enomoto T. Growth state- and cell cycle dependent fluctuation in the expression of two forms of DNA topoisomerase KK and possible specific modification of the higher molecular weight form in the M phase. *J Biol Chem* 1994; 269:1173-1176.
63. Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. Proliferation and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Diff* 1991; 2:209-214.
64. Darby ML, Schmitt B, Jongstra-Bilen J., Vosberg H-P. Inhibition of calf thymus type II DNA topoisomerase by poly (ADP-ribosylation). *EMBO J* 1985; 4: 2129-2134.
65. Davies SM, Robson CN, Davies SL, Hickson ID. Nuclear topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J Biol Chem* 1988; 263: 17724-17729.
66. Odaimi M, Andersson BS, McCredie KB, Beran M. Drug sensitivity and cross-resistance of the 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide-resistant subline of HL-60 human leukemia. *Cancer Res* 1986; 46:3330-3333.
67. Lee M-S, Wang JC, Beran M. Two independent amsacrine-resistant human myeloid leukemia cell lines share an identical point mutation in the 170 kDa form of topoisomerase II. *J Mol Biol* 1992; 223:837-843.
68. Danks MK, Warmoth MR, Friche E et al. Single strand conformational polymorphism analysis of the Mr 170,000 isozyme of DNA topoisomerase II in human tumor cells. *Cancer Res* 1993; 53:1373-1379.

69. Patel S, Fisher LM. Novel selection and genetic characterisation of an etoposide-resistant human leukaemic CCRF-CEM cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67:456-463.
70. Mirski SEL, Evans CD, Almquist KC, Slovak ML, Cole SPC. Altered topoisomerase II α in a drug-resistant small cell lung cancer cell line selected in VP-16. *Cancer Res* 1993; 53:4866-4873.
71. Feldhoff PW, Mirski SEL, Cole SPC, Sullivan DMM. Altered subcellular distribution of topoisomerase II α in a drug resistant human small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* 1994;54:756-762.
72. Mirski SEL, Cole SPC. Cytoplasmic localization of a mutant Mr 160,000 topoisomerase II α is associated with the loss of putative bipartite nuclear localization signals in a drug resistant human lung cancer cell line. *Cancer Res* 1995; 55:2129-2134.
73. Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 1991; 64:615-623.
74. Ponce de León V. Cambios de la Resistencia múltiple a drogas por cultivos tridimensionales de líneas celulares de cáncer de pulmón. Tesis de Licenciatura en proceso.
75. Harker WG, Slade D., Parr RL, Feldhoff PW, Sullivan DM, Holguin MH. Alteration in the Topoisomerase II α gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II β enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Res* 1995; 55: 1707-1716.
76. Dereuddre S, Frey S, Delaporte C, Jacquemin Sabion A. Cloning and characterisation of full length cDNAs coding for the DNA topoisomerase II β from

Acta 1995; 1264: 178-182.

77. Austin CA, Marsh KL. Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *BioEssays* 1998; 20:215-226.

78. Yu Q, Mirski SEL, Sparks KE, Cole SPC. Two COOH-Terminal Truncated Cytoplasmic Forms of Topoisomerase II alfa in a VP-16 Selected Lung Cancer Cell Line Result from Partial Gene Deletion and Alternative Splicing. *Biochemistry* 1997; 36: 5868-5877.

79. Mirski SEL, Gerlach JH, Cummings HJ, Zimigibl R, Greer PA, Cole SPC. Bipartite Nuclear Localization Signals in the C Terminus of Human Topoisomerase II alfa. *Experimental Cell Research* 1997; 237: 452-455.

80. Cardenas ME, Dang Q, Glover CVC, Gasser SM. Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II in vivo. *EMBO J* 1992; 11:1785.

81. Wells NH, Addison CM, Fry AM, Ganapathi R., Hickson ID. Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II alfa protein in vivo and is a substrate for casein kinase II in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269: 29746-29751.

TABLA DE ABREVIATURAS

Topo II α :	Topoisomerasa II α
Topo II β :	Topoisomerasa II β
Topo II:	Topoisomerasas tipo II
Topo I:	Topoisomerasa tipo I
GSTs:	Transferasas de Glutación
GSH:	Glutación
MRP:	Proteína de Resistencia Múltiple
MDR-1:	Gen de Resistencia Múltiple
ADN:	Acido Desoxirribonucleico
ARN:	Acido Ribonucleico
ARN ^m :	Acido Ribonucleico mensajero
ADN ^c :	ADN complementario
RT-PCR:	Transcripción inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
pUC-19:	Plásmido
kADN:	Cinetoplasto
VP-16:	Etopósido
m-AMSA:	m-Amsacrina
DXR:	Doxorrubicina
CPT:	Camptotencina
5-Flu:	5-Fluoruracilo
MTX:	Mitoxantrona
Ara-C:	Arabinosido de Citoxina

APENDICE

Soluciones*Amortiguador de Fosfatos (ASF)*

NaCl.....	8mM
KCl.....	2mM
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	1.5mM
KH ₂ PO ₄	2.4mM

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Amortiguador A

NaCl.....	50 mM	pH 6.8
KH ₂ PO ₄	1mM	
MgCl ₂	5mM	
EGTA.....	1mM	
DTT.....	0.2mM	
PMSF.....	1mM	

Amortiguador B

Tris-HCl.....	50mM	pH 7.5
EDTA.....	1mM	
NaCl.....	1M	
DTT.....	0.1mM	
PMSF.....	1mM	

Amortiguador TBE

Tris-Borato.....	0.1M	pH 8.3
EDTA.....	2 mM	

Amortiguador TE

Tris-HCl.....	10mM	pH 8.0
EDTA.....	1 mM	

Amortiguador de Tris 5x

Tris-HCl.....	50 mM	pH 7.9
MgCl ₂	25 mM	
DTT.....	0.5 mM	
Albúmina.....	30 µg/µl	
ATP.....	1 mM	

Solución 1

Tris-HCl25 mM pH 8.0
Glucosa 50 mM
EDTA..... 10 mM

Solución 2

NaOH..... 0.2 N
SDS 1.0%

Acetato de Potasio 5M pH 4.8

Acido Acético Glacial 11.5 ml
H2O28.5 ml
Acetato de Potasio 5M60 ml

Amortiguador de muestra

Tris-HCl.....200 mM pH 8.4
Sacarosa.....0.5 M
EDTA..... 5 mM pH 8.0
Azul de Bromofenol.....0.03 %

Amortiguador de corrida

Tris0.025 mM
Glicina.....0.19 M
SDS0.01 %

Amortiguador de transferencia

Tris..... 125 mM
Glicina.....960 mM
Metanol.....20 %

ASF- Tween

Tween.....0.01 %
En ASF