

90
CEJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS EN LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGAS POR CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN.

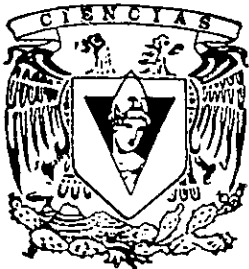
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

VALERIA PONCE DE LEÓN SUÁREZ



M. en I.B.B. RAÚL BARRERA RODRÍGUEZ

MÉXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

251042

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"CAMBIOS EN LA RESISTENCIA MULTIPLE A DROGAS POR CULTIVOS
TRIDIMENSIONALES DE LINEAS CELULARES DE CANCER DE PULMON"

realizado por Valeria Ponce de León Suárez

con número de cuenta 9452916-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en IBB. Raúl Barrera Rodríguez.

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales.

Propietario

Dr. Emilio Rojas del Castillo.

Suplente

Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas

Suplente

Dra. Alejandra Ponce del Paso

PROFESOR DEL PASO
FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología



Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Con todo mi cariño y agradecimiento a:

Mirna E. y Eduardo.

A mis hermanas Mirna Elena y Marianna.

Por su invaluable amor, sus retos y por su gran apoyo.

A mi tío Coke por su amor, su poesía y su arte.

A Hash, Yayis y Anna por darme siempre su amor.

A Cata por enseñarme la importancia de las exigencias.

A mis tíos Rosa Linda y Favio; Rosaura y Ricardo; por su gran cariño.

A Regis, Sandy, Fa y Richy por crecer y compartir infinidad de cosas conmigo, por sus
porras.

A mis amiguitas del Colegio Laura, Susana, Paola y Ana Gabriela.

A mis amigotes de la Universidad a Ma. Elena por su enorme apoyo siempre, Rashidi,
Yvonne, Mariana, Erendira, Leo, Víctor, Sirobska, Armando y Norman. Por compartir
alegrías y tristezas, por ser...AMIGOS!.

Al Dr. Raúl Barrera por su sorprendente paciencia hacia mí, por compartirme sus
conocimiento.

A Cristina Negrete por su ayuda.

A Doña Rosita Nieto por sacarme de apuros en el laboratorio.

A Dios y a todos los ángeles que me acompañaron durante todo el camino. GRACIAS.

A los que dudaron...

A los que creyeron...

A los que me apoyaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por darme la
oportunidad.

A México.

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
II.1 Epidemiología del cáncer de pulmón	2
II.2 Biología del cáncer	4
II.3 Clasificación histológica del cáncer de pulmón.	5
II.4 Cultivos de líneas celulares tumorales	6
II.4.1 Cultivos en monocapa	6
II.4.2 Cultivos tridimensionales	7
II.5 Terapias contra el cáncer	9
II.6 Resistencia múltiple a fármacos	11
II.6.1 Glicoproteína P	12
II.6.2 MRP (<i>multidrug resistance related protein</i>)	13
II.6.3 Topoisomerasas	14
II. 6.4 Transferasa-S de glutatión	16
III. OBJETIVOS	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VI. RESULTADOS	26
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIONES	56
IX. ABREVIATURAS	57
X. SOLUCIONES	58
XI. REFERENCIAS.	59

I. RESUMEN

El cáncer es hoy en día una de las primeras cinco causas de muerte a nivel mundial. Aunque existen varios tipos de cáncer, el de pulmón es actualmente responsable de más del 50% de las muertes provocadas por dicha enfermedad. La incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón, está íntimamente relacionada con tabaquismo y con una baja respuesta a quimioterapia. La razón por la que el cáncer de pulmón no responde a la quimioterapia se debe al fenómeno de resistencia múltiple a drogas, el cual se presenta cuando los tumores tienen una baja sensibilidad al ser expuestos a distintos fármacos. Los mecanismos directamente involucrados en la multiresistencia son: bombas de eflujo (MDR-1 y MRP) y las transferasas de Glutación (GST). Así mismo, las topoisomerasas son enzimas también relacionadas con la multiresistencia, ya que son el blanco de múltiples drogas como las epipodofilotoxinas (VP-16 y VM-26), doxorubicina, etc.

Con la finalidad de obtener una mayor aproximación del fenómeno *in vivo*, se han desarrollado cultivos tridimensionales (3D), los cuales pueden ser modelos muy útiles para estudiar el fenotipo de multiresistencia *in vitro*. Al realizar cultivos 3D de dos líneas celulares de cáncer de pulmón (INER-37 e INER-51.0), se observaron cambios en la morfología celular así como en la velocidad de proliferación. La sensibilidad a fármacos también se vio fuertemente modificada, ya que se encontró un aumento mayor a 500 veces en la resistencia a VP-16, VM-26, CPT, ARA-C, 5-FU y MTX y 100 veces a DXR. El análisis de la expresión de los genes de multiresistencia en INER-37 (3D) mostró un aumento en la expresión de Topo II β , MRP, MDR-1 y p53; mientras que Topo II α , Topo I y GST- μ no presentaron cambios. En la línea INER-51.0 (3D), los cambios de expresión génica fueron diferentes, ya que aumentó Topo II β y disminuyó Topo II α , permaneciendo sin cambios MDR-1 y Topo I. Los genes MRP, GST- μ y p53 no fueron expresados.

Las alteraciones en la morfología, velocidad de proliferación, expresión de genes de multiresistencia y el aumento en la sensibilidad a drogas en cultivos tridimensionales, muestran que el fenotipo de resistencia múltiple, es un fenómeno complejo que no depende de un mecanismo único y sí de la actividad concertada de una compleja red de eventos celulares y moleculares.

II. INTRODUCCION

El cáncer es, hoy en día, una de las cinco primeras causas de defunción tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo y se calcula que cada año mueren cerca de 4, 300 000 personas a causa de esta enfermedad.¹

Las formas predominantes de cáncer varían de un país a otro. Así, en los Estados Unidos los tipos más comunes de cáncer son los de pulmón, intestino grueso y mama; mientras que en México encontramos las leucemias y linfomas en hombres; y el cáncer de cuello uterino y mama en mujeres.²

Uno de los tipos de cáncer que ha cobrado mayor importancia en los últimos años es el carcinoma del pulmón, ya que su incidencia se ha incrementado en todo el mundo, a diferencia de otros tumores como el de estómago que parece disminuir.¹

II.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE PULMÓN

Durante años, el cáncer más frecuente dentro de los tumores malignos ha sido el cáncer de pulmón. En hombres este tumor se presenta en el 35% de los casos de cáncer y en los países nórdicos se ha observado que 97 hombres de cada 100,000 mueren a causa de esta enfermedad. En el caso de las mujeres este tipo de cáncer se ha ido incrementando durante los últimos años en todo el mundo, encontrándose como uno de los primeros tumores fatales desde 1980.³

El cáncer de pulmón es la causa principal de mortalidad en hombres y mujeres de Estados Unidos y representa el 28% de todas las muertes anuales por cáncer. En 1990 se reportó en este país, un índice de mortalidad de 75.6 en hombres y 31.7 en mujeres por cada 100,000 habitantes. Los estudios epidemiológicos han demostrado que desde 1973 hasta 1990 se ha incrementado la mortalidad hasta en un 40.7%, pero cabe recalcar que este

incremento ha sido notoriamente marcado en la población femenina (126.5%), en comparación con el incremento de la población masculina (18.8%).^{3,4}

En México, la Dirección General de Epidemiología reportó que durante el período de 1982 a 1988 el cáncer de pulmón presentó un aumento en su incidencia. En 1990 se reportó que los tumores malignos eran la segunda causa de muerte, con un índice de mortalidad de 49.1 por 100,000; siendo superado únicamente por el cáncer de cervix y el de mama en mujeres; y las leucemias, linfomas, cáncer de próstata y cáncer de estómago en los hombres. Así, el cáncer es una de las principales causas de muerte en la población mexicana y es sólo menor en comparación a las muertes producidas por las enfermedades cardiovasculares y los accidentes automovilísticos.⁵

Varios factores que predisponen al desarrollo del cáncer de pulmón han sido identificados, tales como la distribución geográfica, la edad, el sexo, ocupación, etc., sin embargo, uno de los más fuertemente asociados es la adicción a fumar. Se estima que la adicción al cigarrillo es responsable del 80% del cáncer pulmonar y sólo del 30% de otros tipos de cáncer. La benzopiridina presente en el tabaco parece ser el principal componente responsable de la aparición de estos tumores, además de la interacción con otros compuestos como nitrosaminas. La etiología de este tipo de cáncer está también asociada con otros contaminantes como los asbestos, los hidrocarburos poliaromáticos, éter-metilclorados, arsénico, cromo, níquel, radón y las radiaciones.^{6,7}

Estudios realizados recientemente han encontrado una relación directa entre el número, tiempo de exposición al cigarro y el cáncer. Los llamados "fumadores pasivos" también presentan un alto riesgo, ya que el humo del cigarro contiene múltiples agentes tóxicos como los mutágenos y carcinógenos que llegan a tener una elevada concentración.⁸

La proliferación celular es un fenómeno altamente regulado y complejo que involucra la interacción orquestada de varios mecanismos moleculares, los cuales determinan el tiempo en que una célula puede dividirse. En cualquier caso, los genes reguladores pueden clasificarse en aquellos cuyos productos ayudan a estimular la proliferación y aquellos cuyos productos ayudan a inhibirla.

Una de las alteraciones tempranas comunes de los cánceres humanos la constituyen las mutaciones del gen p53 (cromosoma 17p13.1), cuyo producto interviene en los procesos de reparación de ADN, entre otros.^{9,10}

Durante continuos eventos de división mitótica, una célula normal puede acumular un gran número de mutaciones, las cuales con el tiempo podrían ser la causa del desarrollo de una transformación maligna y producir cáncer. En varias ocasiones los genes afectados codifican para proteínas responsables de identificar errores y repararlos durante la duplicación del ADN. Así, los defectos en estos genes conducen a una inestabilidad genética y en consecuencia a un aumento en el número de mutaciones, las cuales serán transmitidas a las células hijas. En un tumor, la inestabilidad genética se traduce en una mayor agresividad de los tumores y el desarrollo de las metástasis.¹¹

Es probable que alteraciones en los genes responsables del control de la proliferación celular tengan un papel importante en el desarrollo de un tumor, sin embargo este evento es un fenómeno complejo y probablemente requiere al menos de 10 eventos independientes para que se produzca.¹²

II. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN

De acuerdo con la OMS (1982), el carcinoma de pulmón se clasifica en cuatro tipos diferentes dependiendo de su morfología (Tabla I).^{3,5} Existen dos grandes grupos: Carcinomas de células pequeñas y carcinomas de células no pequeñas y cada uno de estos grupos tiene un comportamiento clínico distinto.

Tabla I. Clasificación histológica de los tumores del pulmón. Frecuencia de presentación en el INER⁵ en comparación con los Estados Unidos.

Tipo Histológico	INER México (100%)	Estados Unidos (100%)
Carcinoma de células pequeñas (CCP)	10.3	25
Carcinoma de células no pequeñas (CCNP)		
Adenocarcinoma	47.2	30
Epidermoide	37.3	25
Células gigantes	5.2	15

De acuerdo con los datos epidemiológicos de E.U. se ha observado que la incidencia de adenocarcinomas ha ido en aumento. El 19% de los casos corresponden a este tipo, seguido por los carcinomas escamoso y de células pequeñas.^{3,4} En México, el adenocarcinoma es el principal tipo histológico, seguido por el epidermoide.⁵

Los adenocarcinomas se desarrollan predominantemente en la periferia de los pulmones y consisten de estructuras glandulares atípicas, las cuales presentan sustancias mucosas o secreción de vacuolas. Dentro del cuadro clínico el paciente presenta tos, expectoración, disnea y dolor torácico.⁷ A nivel molecular podemos decir que este tipo de tumores presentan predominantemente alteraciones en los miembros de la familia *ras*.¹³

II.4. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES

La habilidad de obtener líneas celulares de cáncer de pulmón (CCP y CCNP) ha permitido un gran avance en la comprensión de la biología del cáncer de pulmón. A través de estos modelos ha sido posible la identificación de algunos marcadores que podrían utilizarse en una mejor identificación y tratamiento de tumores, tales como los marcadores proteicos, genéticos, alteración en las señales de transducción, así como la identificación de algunos mecanismos de resistencia múltiple.^{14,15}

Las líneas celulares de cáncer de pulmón pueden ser establecidas a partir de tejido de biopsias o bien a través de derrames pleurales. En general muchas de estas células conservan las características morfológicas, citogenéticas e histológicas que recuerdan al tumor que les dio origen. Esta característica hace de los modelos de líneas celulares *in vitro* una herramienta de gran utilidad que ha sido relevante no solo en los estudios básicos, sino también la de estudios clínicos. A la fecha existen más de 500 cultivos de células tumorales humanas de pulmón a partir de los cuales se pueden estudiar las características celulares y la biología molecular del cáncer de pulmón.¹⁴

II.4.1. CULTIVOS EN MONOCAPA

Para generar una línea celular, es necesario obtener células tumorales preferentemente del tumor primario, a partir de las cuales se establecen los cultivos *in vitro* (utilizando medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino y factores de crecimiento). Es importante observar y conocer el tipo de células presentes en la muestra de biopsia, para que, a partir de ella se separen las células normales contaminantes y seleccionar las células tumorales que serán perpetuadas a través de varios pasajes, teniendo cuidado además de observar cambios morfológicos o genéticos que se seleccionen en una población.^{13,14}

Frecuentemente, cuando los cultivos se encuentran creciendo rápidamente, a menudo no retienen marcadores de diferenciación. Sin embargo, la iniciación de cultivos en medios definidos frecuentemente hace que se expresen marcadores de diferenciación tales como la secreción de moco en el caso de los adenocarcinomas.¹⁵

Aunque los cultivos *in vitro* de células tumorales son modelos muy utilizados en la investigación oncológica, frecuentemente expresan diferentes marcadores tumorales o lo hacen en concentraciones mayores en comparación con el tumor del que derivan. Esta diferencia puede ser debida a la selección de subclonas acostumbradas al cultivo *in vitro*, o bien a la falta de interacción con células normales (estroma) que se observa en condiciones *in vivo*.¹⁴ Debido a estas diferencias, debe tenerse mucho cuidado al tratar de establecer una correlación entre las propiedades y el comportamiento clínico de un tumor con los de una línea celular creciendo en condiciones *in vitro*.¹⁵

II. 12 CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

Con la finalidad de aproximarse cada vez más a los fenómenos que se presentan durante el desarrollo de los tumores, se han establecido nuevas técnicas de cultivo que se asemejen mejor al tipo de crecimiento *in vivo* de los tumores, mediante el empleo de cultivos tridimensionales (3D).¹⁶

A principios de siglo, Alexis Carrel desarrolló los primeros cultivos de tejidos, utilizando un sistema de cultivo que permitía el crecimiento tridimensional de los tejidos. Leighton mejoró este sistema desarrollando un sustrato con matriz de esponjas.¹⁶ Durante los últimos 30 años los cultivos tridimensionales tanto de células normales como malignas han ido progresando, éstos se han utilizado para estudios de organogénesis y otro tipo de investigaciones biomédicas. En contraste con los cultivos homogéneos en monocapa o en suspensión (bidimensionales), los cultivos tridimensionales son capaces de preservar las características bioquímicas y morfológicas similares a las correspondientes al tejido. Una de las principales ventajas que presenta el uso de los cultivos 3D, es un mejor conocimiento de los mecanismos básicos que gobiernan la proliferación y la diferenciación celular, a través

de una forma reproducible, con un ambiente determinado por el metabolismo y la respuesta adaptativa de las células.¹⁶

Por medio de estos cultivos también es posible estudiar las interacciones célula-célula y célula-matriz, junto con su bien definida morfología y fisiología, la cual afecta no solo el tamaño celular, sino también la forma, distribución de los organelos y la actividad enzimática.¹⁷ Actualmente no solo se utilizan para estudios de morfología y fisiología, sino que se están empleando para estudiar la patofisiología, así como para la comunicación e invasión celular, angiogénesis y neovascularización.^{18,19,20} Otras investigaciones incluyen el efecto del microambiente en la proliferación, diferenciación y muerte celular y los cambios en la expresión génica^{18,19}. Para el desarrollo de los cultivos 3D, existe una variedad de sistemas de soporte artificial, como el uso de las matrices de colágena, esponjas gelatinosas porosas, espumas de poliuretano, sistema de compartimentos capilares o simplemente agarosa (Figura 1).^{16,17}

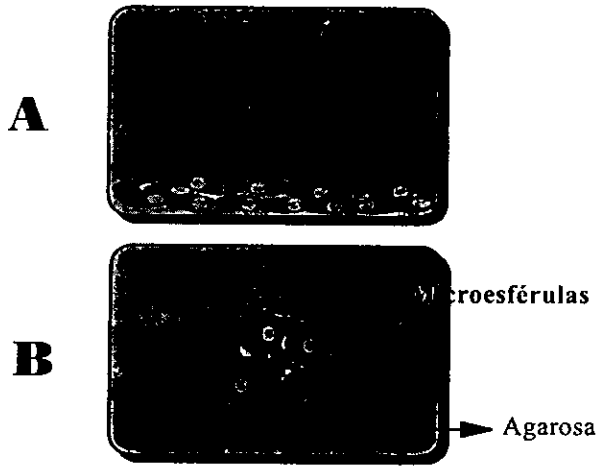


Figura 1. Tipo de cultivos celulares. A) Cultivos en monocapa. Las células se adhieren a la superficie de la caja recubierta de una matriz. B) Cultivos tridimensionales. Formación de microesférulas por la baja o nula adherencia a la superficie de la agarosa.

La importancia del desarrollo de tantas matrices, se debe a las diferentes estructuras tridimensionales que pueden ser obtenidas en los cultivos 3D. En una matriz reticular, la

interacción de las células será primordialmente con la matriz, mientras que al utilizar una base de agarosa, las células solo tienen una pequeña zona de contacto con la matriz y una gran interacción célula-célula. En los cultivos tridimensionales en donde se utilizan sistemas de rotación, la formación de múltiples microesférulas es requerida para experimentos donde se necesiten grandes cantidades de microesférulas sin importar su heterogeneidad.¹⁹

Con los cultivos 3D se ha tratado de recapitular varios pasos en la tumorigénesis del cáncer y la importancia de los contactos celulares. Así, los estudios con tumores de mama con geles de flotación de colágena²⁰, mostraron la importancia de la matriz extracelular durante la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis. En otros estudios, se encontró que la expresión de E-caderinas y las propiedades de unión de las moléculas transmembranales al citoesqueleto son factores esenciales para una fuerte adhesión célula-célula y que los cambios en la organización del tejido es uno de los primeros procesos visibles en el cáncer de mama.^{20,21} Existen también otros casos en los que se induce la diferenciación de estructuras, tales como la formación de ductos con ramificaciones cilíndricas y un lumen central, todo rodeado por células epiteliales polarizadas como el epitelio luminal humano.²²

Finalmente, los cultivos 3D hacen posible comenzar a comprender los mecanismos morfológicos y bioquímicos fundamentales de las diferentes matrices celulares humanas, dando cabida a estudios de desarrollo embrionario, diferenciación, angiogénesis, etc.^{17,18}

II. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

El cáncer ocasiona la muerte de un individuo debido a que afecta órganos vitales como cerebro, hígado, pulmón, etc. En la mayoría de los tipos de cáncer, especialmente en el cáncer de pulmón una de las mejores formas de prevención, son dejar de fumar y

mantener buenos hábitos alimenticios. La detección temprana del cáncer permite que se apliquen terapias antes de que el tumor invada o produzca metástasis en otros órganos.^{7,21}

La cirugía es recomendable cuando los pacientes presentan estadios tempranos de avance (I, II) pero tan solo en E.U., únicamente el 25-30% de los pacientes con cáncer de pulmón (células no pequeñas) se encuentran en esta etapa clínica al momento del diagnóstico. A los pacientes con estadios más avanzados (III, IV), la cirugía y/o la radioterapia solo les ofrece una baja probabilidad de supervivencia.⁷

Debido al pobre poder curativo de la terapia de radiación y cirugía, la quimioterapia sola o combinada con cirugía o radiación, resultan ser más útiles. En ocasiones se administran agentes químicos antes de la cirugía con el fin de obtener mejores resultados, ya que los tratamientos paliativos solo son utilizados para proporcionar al paciente una mejor calidad de vida.

La quimioterapia es uno de los tratamientos más eficaces contra el cáncer. La eficacia de los fármacos depende del tipo de cáncer; condiciones biológicas y fisiológicas del paciente, grado de desarrollo y grado de diseminación del tumor. Los tipos de fármacos que se utilizan varían en su forma de actuar y pueden estar relacionados con el bloqueo de rutas metabólicas (antimetabolitos) o las fases del ciclo celular (alquilantes), para tratar de producir la muerte a las células en división.^{24,25}

Los agentes específicos del ciclo celular son aquellos que causan mayor muerte celular, ya que producen bloqueos bioquímicos en una o varias fases del ciclo celular. A pesar de que estos no dependen de una dosis específica, es necesario aplicarlos varias veces. En cambio, los agentes inespecíficos de fases del ciclo celular son fármacos que producen una respuesta en relación directa con la dosis de exposición, obteniendo muerte celular exponencial a pesar de que los tumores presenten una división lenta, por lo cual se dan tratamientos agresivos para eliminar las últimas células cancerosas en proceso de crecimiento (Figura.2).^{24,25}

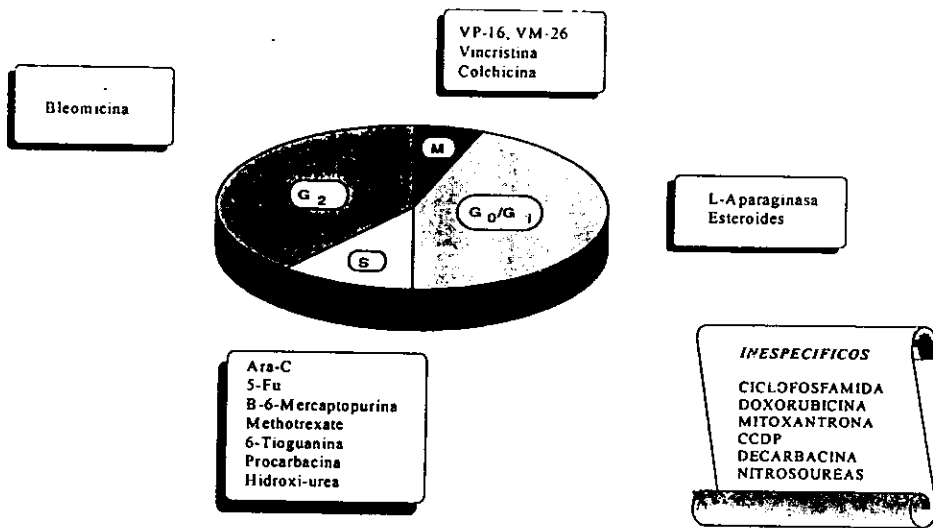


Figura 2. Actividad de fármacos antineoplásicos durante el ciclo celular

II. RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS

Uno de los principales problemas que se presentan en el tratamiento del cáncer pulmonar es el fenómeno conocido como multiresistencia a fármacos (MDR o *multidrug resistance*). En líneas de células tumorales este fenómeno se caracteriza porque las células presentan resistencia a una gran variedad de fármacos anticancerosos no relacionados y en condiciones normales funciona como un mecanismo de desintoxicación.^{26,27} En células tumorales, el fenómeno trae como resultado una deficiencia en la captación, acumulación intracelular o disminución de la actividad de los fármacos y en consecuencia, resistencia.^{26,28}

Se conocen dos mecanismos de resistencia a fármacos: el intrínseco y el adquirido. En el mecanismo adquirido, los tumores se vuelven resistentes cuando son expuestos a diferentes dosis de una gran variedad de agentes antineoplásicos, fenómeno que es claramente observado en los laboratorios al exponer CCP a fármacos. El mecanismo intrínseco por su parte, se presenta cuando las células del tumor son desde el principio

totalmente insensibles a la quimioterapia. Este tipo de resistencia puede deberse a la expresión constitutiva de genes de multiresistencia (p.ej. carcinoma renal, CCNP, cerebro).^{26,28,29}

Entre los mecanismos celulares que producen la resistencia tenemos: los cambios en la permeabilidad de la membrana, alteraciones en el transporte de las drogas hacia su blanco, amplificación génica de las enzimas y substratos, y cambios en la susceptibilidad al daño producido por los fármacos (principalmente modificaciones en los mecanismos de reparación del ADN).^{26,30}

En el caso particular de los tumores de pulmón, es frecuente encontrar que la mayoría de los CCP desarrollan una resistencia a la quimioterapia, mientras que en los CCNP la resistencia es innata.

Desde 1973 gracias a los estudios de Dano y cols.³¹, se tuvieron las primeras evidencias de los mecanismos de extrusión de fármacos relacionados con la resistencia. Uno de los primeros mecanismos descritos, asociados con la reducción de la acumulación de fármacos fue la participación de glicoproteína-P, producto del gen MDR-1.

II. Glicoproteína-P (gp-P)

Esta glicoproteína presenta un peso molecular de 170 kDa y a nivel génico está codificada por dos genes denominados MDR-1 y MDR-2, los cuales se localizan en el cromosoma 7q21.1³⁰. La gp-P, es miembro de la familia de transportadores ABC (bombas de flujo dependientes de ATP) y presenta doce dominios hidrofóbicos integrales a la membrana y dos sitios de unión a ATP localizados en la cara citoplasmática. En células tumorales, a esta proteína se le une el fármaco, lo secuestra y expulsa de la célula. Aunque su mecanismo de acción no se conoce completamente, se postula que el fármaco se une inicialmente a sitios específicos localizados en la región citoplasmática de la molécula y posteriormente es transportado activamente hacia el exterior. También se cree que gp-P

actúa como una enzima “Flip-Flop”, ya que la mayoría de los fármacos son lipofílicos y tienen estructuras químicas diferentes.^{28,30,32}

La sobreexpresión de gp-P provoca una baja concentración y un flujo aumentado del fármaco hacia el exterior de la célula, lo cual genera la resistencia. En tejidos normales como el tracto gastrointestinal, hígado, riñón y páncreas, en la superficie luminal de las células se observan niveles elevados de ARN o la proteína, probablemente debido a que estos tejidos llevan a cabo procesos de desintoxicación. Así, la expresión de gp-P no es propia de los tumores.¹⁵

Muchos de los cánceres tanto CCP y CCNP y tejidos pulmonares no malignos presentan relativamente bajos o indetectables niveles de gp-P. En contraste con el cáncer de pulmón, en el cáncer de colon y riñón, se presenta una alta expresión de esta proteína y en parte esto explica la alta quimioresistencia de estos tumores.^{15,28} En la mayoría de los tumores hematológicos y algunos tumores sólidos, el grado de expresión del ARN o la proteína se correlaciona directamente con la multiresistencia. Así en la leucemia mieloide aguda, el mieloma múltiple, linfoma maligno y el sarcoma en niños, un aumento de gp-P esta asociado no solo con resistencia a fármacos, sino también con un pobre pronóstico de la enfermedad.²⁸

II-62- MRP (multidrug resistance related protein)

En 1992 el grupo de S. Cole³³, describió un nuevo mecanismo de resistencia al trabajar con una línea celular resistente a doxorubicina (H69AR) y que no expresaba la gp-P.³⁴ Este nuevo mecanismo involucra la expresión de una proteína de 190 kDa denominada MRP³⁵, la cual también pertenece al grupo de transportadores ABC y tiene una gran homología con el transportador de iones (Cl⁻) que produce la fibrosis quística (CFTR), y una homología distante con la glicoproteína-P.^{35,36,37} Esta proteína se localiza predominantemente en membrana plasmática, aunque se ha observado que en algunas líneas celulares se encuentra en retículo endoplásmico.²⁸

El gen que codifica para la proteína MRP está localizado en el cromosoma 16p13.1.^{28,35} La proteína MRP es un candidato alternativo a gp-P como mecanismo de resistencia múltiple, debido a que líneas celulares con el fenotipo de resistencia que no expresan MDR-1, sobreexpresan MRP.

Debido a que esta proteína se expresa en casi todas las líneas celulares de CCNP, se ha sugerido que está asociada con la resistencia a fármacos.^{15,28} En tejidos normales el ARNm de MRP es expresado en bajos niveles, pero los niveles son altos en pulmón, testículo y músculos normales.^{28,36}

163 TOPOISOMERASAS

La topología del ADN es regulada por las proteínas denominadas topoisomerasas. Las topoisomerasas son enzimas que están encargadas de eliminar la tensión de torsión, por medio del corte de una o ambas hebras de ADN, lo que permite la formación de las horquillas esenciales para la replicación; además de que intervienen en los procesos de recombinación, transcripción, traducción y segregación de los cromosomas. Se conocen dos tipos de topoisomerasas (tipo I y II), las cuales parecen tener no solo distintas funciones, sino también una localización intracelular diferente (Tabla II).

La topoisomerasa I (Topo I) es la enzima encargada del corte y la reunión de solo una cadena en el ADN. El fármaco captotepcina y sus derivados, tienen como blanco esta enzima.

A pesar de que existen varias evidencias de la participación de las Topo I en la resistencia a fármacos, el papel mas importante se le ha atribuido a las topoisomerasas de tipo II (Topo II).^{26,28,38}

TABLA II. Principales características de las Topoisomerasas humanas

CARACTERÍSTICAS	Topoisomerasa I	Topoisomerasa II
Capacidad de cortar y unir el ADN	si	si
Cromosoma	20q11.2-13.1	α :17q21-2 β :3p24
Tamaño (subunidades)	91 kb. (monómero)	174 kb (homodímero)
Dominio de unión al ADN	si	si
No. de cortes en la cadena de ADN	Uno	Dos (cuatro pares de bases aparte)
Requerimiento de metales	no	Mg
Requerimiento de energía	no	ATP
Ciclo celular	Equitativamente constante, elevada en fase S para transcripción.	Elevada durante G ₂ y mitosis para ayudar en la replicación, división celular, proliferación.
Localización	Nucleolo	Núcleo
Inhibidores		VP-16, VM-26, DXR otros.
Pequeños compuestos con 2-5 anillos planos capaces de interactuar entre los pares de bases.	camptotecina	

Las enzimas topoisomerasas II (Topo II) presentan una actividad de corte sobre ambas hebras del ADN, liberando la tensión de torsión. Para esta actividad es necesaria la presencia de ATP así como de magnesio. La importancia de esta enzima en cáncer radica en que múltiples fármacos, tanto agentes terapéuticos como antiparásitos, antivirales y drogas antineoplásicas tienen como blanco dichas enzimas.

Existen dos isoformas de Topo II: Topo II α y Topo II β .²⁸ La Topo II α tiene un peso molecular de 170 kDa y es codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 17q21-22; mientras que en Topo II β , el peso molecular es de 180 kDa y el gen se localiza en el cromosoma 3p24.³⁹ A pesar de la alta homología que existe entre ambas enzimas (90% a nivel de proteína y 80% a nivel génico) y a que parecen compartir algunas funciones, la localización intracelular es diferente, con Topo II α localizada en el nucleoplasma y Topo II β en el nucleolo (en células de ratón ambas enzimas se localizan en la misma región del núcleo).^{31,41} La concentración de cada una de ellas es también diferente y depende de la fase del ciclo celular. Las diferencias entre ambas enzimas hace pensar no solo en actividades diferentes sino también que presentan una sensibilidad distinta a fármacos.^{41,42}

A través del ciclo celular la concentración de Topo II α se modifica. La síntesis de Topo II α comienza en las células que pasan de fase G₁ a fase S, con un nivel máximo al final de G₂ y mitosis. Posterior a la mitosis, se disminuye drásticamente la expresión y una cantidad significativa de proteína es degradada.^{43,44} En el caso de Topo II β se ha reportado que los niveles del transcrito y la proteína permanecen constantes a lo largo del ciclo celular.^{28,39}

Los fármacos que interaccionan con Topo II α , estabilizan la unión de Topo II α -ADN e interfieren con la habilidad enzimática para religar las hebras, por lo que se conocen como inhibidores de Topo II. Entre los fármacos más utilizados en quimioterapia y los cuales parecen presentar mayor sensibilidad están las epipodofilotoxinas: etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26). En células resistentes a fármacos, las alteraciones en esta enzima involucran: reducción en la concentración intranuclear de Topo II α , mutaciones que alteran el sitio de unión al fármaco o cambian su actividad^{27,53}, así como cambios en la localización intracelular.^{46,47}

II. TRANSFERASAS DE GLUTATIÓN (GST)

Las transferasas-S de glutatión (GSTs) son enzimas dimericas capaces de desintoxicar un gran número de sustancias electrofilicas carcinógenas. Las GSTs presentan varias isoformas clasificadas de acuerdo a su punto isoeléctrico en básicas (GST α - ϵ), neutras (GST- μ) y ácidas (GST π - ρ). Estas isoenzimas se presentan en homodímeros o heterodímeros. Su distribución en los distintos tejidos es variable, por ejemplo: GST- ρ es abundante en placenta, pulmón, cerebro, eritrocitos y el cristalino de ojo, mientras que en hígado se presenta en bajas concentraciones y predomina la GST- π .^{48,49}

El humo del cigarro contiene múltiples hidrocarburos poli-aromáticos que parecen ser los principales compuestos que funcionan como sustratos para estas enzimas, siendo más efectiva la GST- μ . El locus del gen para la GST- μ es polimórfico y contiene dos variantes génicas bien caracterizadas y un alelo nulo.⁴⁸ La presencia o ausencia, así como el

número de copias del gen GST- μ parecen determinar la actividad enzimática de la GST- μ en pulmón. La asociación de estas enzimas con la susceptibilidad al desarrollo del cáncer aun no es clara, así, en estudios realizados en pacientes con CCP, la baja expresión de la GST- π se relaciona con una alta susceptibilidad, pero en el caso de CCNP esta asociación no se presenta.^{48,49}

Además de la susceptibilidad genética al cáncer, la expresión de la GST parece estar relacionada con el desarrollo de quimioresistencia. Un incremento en el cuerpo sugiere que las enzimas dependientes de glutatión son un importante factor que determinan la sensibilidad de tumores de pulmón y líneas celulares a drogas citotóxicas.^{49,50} Marcadas diferencias en los niveles de glutatión (GSH) y la actividad de tres o cuatro enzimas relacionadas con GSH fueron observadas en la línea celular resistente a múltiples drogas H69AR, con respecto a su célula parental. Sin embargo, estos cambios no parecieron afectar el sistema de GSTs.^{15,50} Al realizar estudios para establecer una relación directa entre el aumento de la actividad de GST- π y la resistencia a fármacos, se ha visto que en algunos tipos de cáncer como el de colon y mama, esta sí se presenta. En tumores de cerebro, un aumento de GST parece ir unido al grado de malignidad y el aumento de su actividad enzimática puede ser un buen marcador de recurrencia.⁴⁸

II OBJETIVOS

Objetivo general

- ◆ Determinar si existen cambios en los patrones de resistencia múltiple a drogas en cultivos tridimensionales de líneas celulares de cáncer de pulmón, en comparación con cultivos en monocapa

Objetivos específicos

1. Caracterización morfológica de las líneas celulares de cáncer de pulmón, al ser cultivadas en sistemas 3D.
2. Determinar los patrones de crecimiento de las células tumorales en cultivos 3D.
3. Análisis de la expresión de genes asociados con la resistencia a fármacos en los diferentes tipos de cultivos.
4. Valoración del modelo de cultivo 3D de células tumorales en el estudio de los mecanismos de resistencia.

IV. HIPÓTESIS

La interacción célula-célula en los cultivos 3D de cáncer de pulmón produce cambios intracelulares que conllevan a una activación de genes de multiresistencia y en consecuencia a un aumento en la resistencia a drogas.

Líneas celulares

Las líneas celulares denominadas INER-37 e INER-51.0 corresponden a dos líneas celulares tumorales obtenidas a partir de una muestras de derrames pleurales de pacientes con cáncer primario de pulmón. Ambas líneas celulares fueron adaptadas al crecimiento *in vitro*, en medio RPMI-1640 (Sigma,Co). En el caso de INER-37, durante los primeros meses del cultivo la línea presentó un crecimiento lento que posteriormente se incrementó. En los primeros pasajes, INER-37 mostró polimorfismo, con células alargadas de núcleo central y con uno a dos nucleolos. Estas células llegaron a formar agrupaciones celulares parecidas a estructuras glandulares. Un análisis citológico reportó que esta línea celular fue positiva para PAS, p53 mutado, AgNor (nucleolos) y negativa para queratina citoplásmica, por lo que fue identificada como un adenocarcinoma bien diferenciado. En el caso de la línea INER-51.0, también las primeras etapas del crecimiento *in vitro* fueron lentas y con polimorfismo celular. En cultivo, estas células presentaron una baja adherencia a la caja y formaron agregados en forma de racimos. La citología de INER-51.0 mostró negatividad para citoqueratina y PAS, por lo que fue identificada como un adenocarcinoma poco diferenciado.

Ambos tipos celulares fueron mantenidos en frascos T₂₅ o T₇₅ (Costar) con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma,Co.), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, a 37°C en atm. húmeda con 0.5% de CO₂.

Ensayos de citotoxicidad

a) Cultivos en monocapa.

A partir de cultivos en fase de confluencia (frascos T₂₅ o T₇₅), se obtuvo una suspensión celular mediante la adición de 0.5-1 ml de tripsina en solución salina de fosfatos (ASF). Las células obtenidas fueron lavadas con 10 ml de ASF y se determinó el número y la viabilidad celular con ayuda del colorante vital azul tripan (Sigma) y un hemocitómetro. La suspensión celular (normalmente de $5-7 \times 10^5$ céls./ml y con una viabilidad de más del 95%) fue ajustada hasta obtener 5×10^4 céls./ml y las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos con 180 µl/pozo, para tener una concentración final de $0.5-1 \times 10^4$ céls./pozo. Finalmente, a cada pozo se le adicionaron 20 µl de fármaco en medio de cultivo a diferentes concentraciones (Tabla III).

Los cultivos fueron incubados durante 72 hrs a 37°C en atmósfera húmeda con 0.5% de CO₂. Todos los experimentos fueron realizados por sextuplicado. Transcurrido el tiempo de incubación se les retiró el medio de cultivo y se les adicionaron 20 µl de MTT⁵¹ (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-bromuro de difenil-tetrazolium; 2mg/ml) dejando incubar durante 4 hrs a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 180 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), lo cual permitió la solubilización de los cristales de formazán, dando como resultado la obtención de un color azul y la prueba colorimétrica. Posteriormente se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector para ELISA.

Nota: El ensayo de MTT, se basa en la actividad presente en células vivas de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el sustrato MTT, el cual es convertido en un colorante insoluble, el formazán.

b) Cultivos tridimensionales.

De la misma forma que en los cultivos en monocapa, las células para los cultivos 3D fueron obtenidas a partir de cultivos en confluencia, los cuales fueron tripsinizados para obtener una suspensión celular, en la que la viabilidad y el número de células fueron

determinados con azul de tripan. A partir de una suspensión celular con 5×10^5 céls./ml, se sembraron placas de 96 pozos con 135 μ l/pozo (5,000 células). Previamente, todos los pozos fueron cubiertos con un colchón de agarosa al 1% en D-MEM (50 μ l). En estas condiciones, los cultivos fueron incubados a 37°C durante 72 hrs. Transcurrido este tiempo, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo de cada uno de los pozos (135 μ l) y se adicionó medio de cultivo nuevo, además de 15 μ l de un fármaco diluido a diferentes concentraciones. La actividad citotóxica de los fármacos fue determinada después de 72 hrs. mediante el ensayo de MTT, solo que las microesferas fueron colocadas en tubos de 500 μ l, a los cuales se les agregaron 100 μ l de DMSO y se agitaron fuertemente. La lectura final fue realizada en lector de placa para ELISA en las condiciones anteriormente descritas. Todos los experimentos fueron realizados por sextuplicado.

TABLA III. Concentración de los fármacos utilizados en el trabajo experimental.

Fármaco	Solución original (mM)
VP-16	33.9
VM-26	15
DXR	1
CPT	1
5-FU	192.3
MTX	55
Ara-C	82.23

Curva de crecimiento celular en cultivos 3D por valoración de proteínas totales

En placas de 24 pozos se colocaron 5×10^4 céls./pozo de cada una de las líneas celulares (INER-37 e INER-51.0), en un volumen final de 2 ml para los cultivos de monocapa y de 1.75 ml para los 3D. En el caso de los cultivos tridimensionales previo a la siembra celular se le agregaron 250 μ l/pozo de agarosa al 1% en medio D-MEM. Durante

cinco días consecutivos, las células en cultivo 2D fueron obtenidas por tripsinización y se determinó el número y la viabilidad celular. Posteriormente, tanto las células del cultivo 2D como 3D fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min, el botón celular fue solubilizado con 400 µl de SDS 10%. y la concentración de proteína fue cuantificada por la técnica de Lowry-Folin.

Curva de crecimiento determinada mediante MTT.

Se realizaron curvas de crecimiento para cultivos en monocapa y tridimensionales, utilizando placas de 96 pozos y en las cuales se sembraron 5×10^3 células para cada una de las líneas celulares. Diariamente, se realizaron ensayos con MTT para determinar el índice de proliferación celular y obtener la curva de crecimiento. Cada punto experimental fue realizado por sextuplicado.

Cortes histológicos de los agregados celulares

Se realizaron cultivos 3D como se describió anteriormente y las microesférulas fueron extraídas y lavadas por centrifugación en ASF, teniendo cuidado de no disgregar las microesférulas. El botón celular fue fijado en etanol al 80%, deshidratado e incluido en parafina. Se realizaron cortes de 15 micras, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se revisaron bajo el microscopio fotónico con ayuda de un médico patólogo.

Extracción de ARN por la técnica de Trizol

A 5×10^6 células (de una caja de cultivo T₇₅) se le adicionó 1 ml de Trizol y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 0.2 ml de cloroformo y se centrifugó a 12 000 rpm. Posteriormente se separó la fase acuosa y se adicionaron 0.5 ml de isopropanol para precipitar el ARN. El material

purificado fue lavado por centrifugación con etanol al 75%, secado y disuelto en agua con dietilpírocarbonato. Para su cuantificación, se tomó una alícuota y se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 nm, obteniendo la siguiente relación:

$$1 \text{ unidad de Abs}_{260} = 1 \text{ unidad D.O.}_{260} = 40 \mu\text{g de ARN}$$

Análisis por RT-PCR

a) Síntesis de ADNc

Para realizar la síntesis de ADNc, se tomaron 5 μg de ARN y se les adiciono 1 μl de oligo dT y $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ hasta obtener un volumen final de 12 μl . La mezcla se incubo durante 10 min a 70°C. Posteriormente se adicionaron: 4 μl de amortiguador 5X para síntesis de ADNc, 200 mM de dNTPs y 2 μl de DTT y se incubó durante 5 min a 42°C. A continuación se agregó 1 μl de RT (Superscript II RT-Gibco) y se incubó a 42°C durante 50 min y la reacción fue detenida al calentar a 70°C durante 15 min. Con el fin de eliminar los híbridos ARN-ADNc, se utilizó 1 μl de RNAsa "H" (2.5 U/ μl) con incubación de 30 min a 37°C. El ADN fue almacenado a 4°C hasta su uso.

b) Reacción en cadena de la Polimerasa o PCR.

Para realizar el PCR se colocaron 2.5 μl de amortiguador 10X de PCR, 200 mM de dNTPs, 500 pM de cada oligonucleótido, 1.5-2 mM de MgCl_2 , 2.5 U de Taq polimerasa y 1 μl de ADNc. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Programed Therna Controller, modelo PTC-100, MJ Research, INC), durante 35 ciclos. Las temperaturas de alineamiento de todos los oligonucleótidos utilizados se especifican en la **Tabla IV**.

Para el análisis de los fragmentos de amplificación se realizó un gel de acrilamida al 4% en amortiguador de TBE y la visualización de las bandas se llevó a cabo mediante la tinción con bromuro de etidio.

TABLA IV. Características y condiciones de los oligos de amplificación para experimentos de RT-PCR

Nombre del gen	Secuencia de los oligonucleótidos	Temperatura de amplificación	Magnitud (µg)	Longitud (nb)
G3PDH	5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA-3' 5'-GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA-3'	63	0.75	110
GST-μ	5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG -3' 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG-3'	60	0.75	250
Topo I	5'-AAG CAG AGG AAG TAG CTA CG-3' 5'-GCT CAT CTG TTT CCG AGC TT-3'	56	1	206
Topo IIα	5'-TTT AAG GCC CAA GTC CAG TTA AAC-3' 5'-GTA TAA CAA TAT CAT CAA GAT TGT-3'	63	2.5	343
Topo IIβ	5'-GAA GTG TTC ACT AGT AAA ATA CAGT -3' 5'-CAT AAT CTT TCC ATA GCG TAA GGTT -3'	60	0.75	336
MRP	5'-TCT CTC CCG ACA TGA CCG AGG-3' 5'-CCA GGA ATA TGC CCC GAC TTC-3'	60	0.5	140
MDR-1	5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA CC-3' 5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA -3'	55	0.5	150
p53	5'-CAC GGA TCT GAA GGG TGA AA-3' 5'-TCT GTG ACT TGC ACG TAC TC-3'	60	0.5	639
Bcl-2	5'-TCG CTA CCG TCG TGA CCT C-3' 5'-AAA CAG AGG TCG CAT GCT A-3'	55	0.75	392

Cuantificación de proteínas por la técnica de LOWRY-FOLIN

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Lowry-Folin. Como patrón de referencia se utilizó una curva de albúmina a concentraciones de 0, 2, 4 y 6 µg. La cuantificación de color fue evaluada en un espectrofotómetro a 750 nm.

Electroforésis para proteínas.

Para cada una de las líneas celulares en los distintos tipos de cultivos, se obtuvieron 50 µg de proteína, los cuales fueron analizados mediante geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reducidas según el sistema de Leamlí (PAGE-SDS). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante toda la noche, desteñidos con ácido acético 10% y secados.

VI. RESULTADOS

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares de cáncer del pulmón denominadas INER-37 e INER-51.0. Ambas líneas fueron establecidas en nuestro laboratorio a partir de derrames pleurales de dos pacientes con diagnóstico de cáncer primario del pulmón, sin tratamiento previo con quimioterapia.

La línea INER-37 por ser productora de mucopolisacáridos fue identificada como un adenocarcinoma bien diferenciado (Figura 3a). En cultivo *in vitro* estas células presentaron numerosas vacuolas de gran tamaño (llegando a 1/3 del volumen celular) y una fuerte adherencia a la superficie de la caja. Cuando estas células llegaban a un estado de confluencia se observaron estructuras celulares con un arreglo de tipo glandular que recordaban la imagen del tejido del cual fueron originadas.

Para el caso de la línea INER-51.0 fue más difícil su identificación, ya que no fue productora de mucopolisacáridos ni queratina, por lo cual fue identificada como un adenocarcinoma pobremente diferenciado (Figura 3b). Estas células presentaron una menor relación entre núcleo/citoplasma, así como menor adherencia a la caja de cultivo, formando pequeños cúmulos o racimos celulares.

Con la finalidad de conocer la forma y velocidad de crecimiento para ambas líneas celulares (INER-37 e INER-51.0), se realizó un experimento de proliferación celular en cultivos en monocapa. Como se observa en la figura 4, la línea INER-51.0 presentó un crecimiento típico exponencial mientras que INER-37 presentó un crecimiento irregular, con varias pendientes en la curva. Así, se encontró que la velocidad de crecimiento de INER-51.0 fue mayor que la de INER-37, con un tiempo de duplicación de 33.6 hrs. en comparación a INER-37 el cual fue de 57.6 hrs.

Dado que en algunos reportes con líneas celulares crecidas en cultivos 3D^{17,52,53}, se señala una disminución en la proliferación celular, fue importante conocer, si bajo nuestras condiciones experimentales de cultivo 3D se modificaban los patrones de proliferación. Con esta finalidad, se llevaron a cabo estudios de proliferación, pero debido a que la

disgregación de las microesférulas por métodos mecánicos o enzimáticos dañó las células y produjo una subestimación del número celular, se utilizó un método indirecto a través de la cuantificación de proteínas celulares totales. Los resultados mostraron que en los cultivos de monocapa, la concentración de proteína aumentó en relación directa con el número de células hasta las 48 hrs de cultivo, en ambas líneas celulares (Figura 5). Sin embargo, en INER-37 a las 120 hrs, la concentración de proteína fue mayor que la de INER-51.0. El incremento en las proteínas totales de INER-37, puede estar relacionado con el tipo celular y/o el grado de diferenciación.

En los cultivos 3D, el patrón de síntesis proteica fue igual al observado en los cultivos 2D y similar entre los dos tipos celulares (Figura 6). Debido a esto, se sugirió que la velocidad de proliferación en cultivos 3D no estaba siendo afectada.

Con la finalidad de determinar si las semejanzas en la concentración proteica eran un reflejo real de la proliferación, se llevó a cabo un experimento de proliferación celular mediante un ensayo con MTT. Varios experimentos preliminares fueron realizados, con la finalidad de determinar si el sustrato MTT tenía la capacidad de penetrar hasta las capas celulares más internas de las microesférulas. Los resultados mostraron que después de 4 hrs todas las células de la microesférula estaban teñidas por efecto de la reacción. Cuando este tipo de ensayos fue realizado para determinar los cambios en la proliferación de los cultivos 3D, se encontró que en ambos tipos celulares la velocidad de crecimiento disminuyó en comparación con las células cultivadas bidimensionalmente. La disminución de la proliferación fue evidente aun desde las primeras 24 hrs de cultivo y se mantuvo constante hasta las 72 hrs. de cultivo. (Figura 7).

De acuerdo a los resultados anteriores, se llegó a la conclusión de que a 72 hrs. de cultivo 3D, las microesférulas estaban perfectamente formadas y los cambios en el microambiente, producto del metabolismo y la sobrepoblación celular, eran muy pequeños como para afectar la sensibilidad a fármacos. Por esta razón, todos los estudios posteriores se llevaron a cabo a este tiempo.

Con el fin de estudiar la morfología de las microesférulas en cada una de las líneas celulares en cultivos 3D, se llevó a cabo una observación directa bajo el microscopio invertido. En cultivos 3D, las dos líneas tumorales adquirieron una morfología totalmente diferente. En el caso de INER-37, se formaron estructuras multicelulares compactas que con el tiempo fueron creciendo en tamaño (Figura 8A y C). Muchas de las primeras microesférulas parecieron formarse por la unión de las células sembradas al inicio del experimento, ya que estas estructuras fueron evidentes desde las primeras 24 hrs de cultivo. Con el tiempo, el tamaño de las esférulas creció y solo se limitó por la falta de nutrientes en tiempos mayores de 7 días. Para las células INER-51.0, las microesférulas se formaron en grandes racimos y llegaron a adquirir un tamaño mayor a las de INER-37 (Figura 8D y F).

La imagen histológica de las microesférulas de INER-37 mostró una gran compactación celular y solo pequeños espacios entre ellas, probablemente resultado de la unión de las células al momento de formar las esférulas en las primeras horas de cultivo (Figura 9). En INER-51.0 se observó una distribución celular menos compacta, con múltiples espacios entre los racimos celulares (Figura 9'). En ambos casos, se observaron solo algunas figuras mitóticas, tanto en el centro como en la periferia de las esférulas.

Una vez conocida la morfología y la cinética de crecimiento de ambas líneas celulares en cultivos 3D, se analizó el índice de citotoxicidad de distintos fármacos utilizados en quimioterapia (IC_{50} , concentración de fármaco capaz de matar a la mitad de la población celular). Los resultados mostraron que la sensibilidad hacia los fármacos fue afectada fuertemente por el cultivo tridimensional. El aumento en la resistencia se presentó para todos los casos, aun para aquellos fármacos hacia los cuales, las líneas celulares en cultivo 2D presentaron una mayor sensibilidad (Tabla V). Por ejemplo, se observó un aumento mayor a 250 veces para DXR en las células INER-37, con un IC_{50} de $2\mu M$ en cultivos 2D que se incrementó a más de $100\mu M$ en cultivos 3D. Para INER-51.0, el aumento en la resistencia a este mismo fármaco fue mayor de 500 veces con valores de IC_{50} menores a $9\mu M$ en cultivo 2D que aumentaron a más de $100\mu M$ en 3D. En otros fármacos como las epipodofilotoxinas (VP-16, VM-26), CPT, MTX, 5-FU, el aumento en la resistencia también fue muy elevado (Tabla V).

En la **figura 10** se puede observar el comportamiento que presentó INER-37 cuando fue expuesta a distintas concentraciones de los fármacos VP-16, VM-26, CPT y DXR. En todos los casos, los valores de sobrevivencia de las líneas celulares mantenidas bajo cultivo 3D fue completamente diferente a la observada para los cultivos 2D. En INER-37 la actividad citotóxica de 500 μM de VP-16, redujo la sobrevida de las células a 10 % en cultivos de monocapa, pero fue tan solo del 90 % en cultivos 3D (**Figura 10a**), mientras que en INER-51.0 en cultivo 2D, la aplicación de 500 μM de VP-16 disminuyó la sobrevida a un 20%, en comparación con un 75% en cultivo 3D (**Figura 11a**). En el caso del tratamiento con 100 μM de DXR, la sobrevida de las células INER-37 en cultivo 2D fue del 10% pero en cultivo 3D aumento a un 55 % (**Figura 10b**). Para INER-51.0 el comportamiento fue muy similar, ya que con 100 μM de DXR solo se observó una sobrevida del 30%, la cual aumentó a 65% en las microesférulas (**Figura 11b**). Cabe destacar que en ambos tipos celulares, DXR fue el fármaco con mayor actividad citotóxica, pero en cultivos 3D ésta disminuyó notablemente.

Con la finalidad de comprender un poco mas sobre el aumento de la resistencia a fármacos en los cultivos tridimensionales, se analizó la expresión de varios genes implicados en el fenotipo de multiresistencia. En estos experimentos se utilizó como control el gen constitutivo de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). En la **figura 12** se observa la expresión de este gen a partir del ARN de las líneas celulares de pulmón crecidas tanto en cultivos de monocapa como tridimensionales. En todos los casos, la expresión de este gen fue semejante, con bandas de amplificación casi de la misma intensidad.

El análisis de la expresión para los distintos genes de multiresistencia mostró los siguientes resultados: en el caso de Topo II α , INER-37 presentó una alta expresión para este gen, la cual no fue modificada por el tipo de cultivo (**Figura 13, carriles 1 y 2**), mientras que en INER-51.0 se observó una disminución en la expresión de topoiI α cuando las células fueron cultivadas tridimensionalmente (**Figura 13, carriles 5 y 6**). Además, es importante notar que la cantidad de mensajero producido por Topo II α en INER-51.0 en cultivos 2D fue menor que la producida por INER-37. Para Topo II β , los resultados mostraron un incremento en la expresión de este gen al cambiar las células de cultivos 2D

al 3D tanto en INER-37 como en INER-51.0 (Figura 13, carriles 3, 4 y 7, 8 respectivamente.)

Los cambios en la expresión de MDR-1 fueron mas complejos, ya que para INER-37 en cultivo 2D no se observó transcrito, pero cuando las células fueron crecidas en cultivos 3D, se observó expresión del gen (Figura 14, carriles 1 y 2); contrariamente, en INER-51.0 la expresión de MDR-1 fue igual e independiente del tipo de cultivo (Figura 14, carriles 5 y 6). Un resultado totalmente diferente se presentó con el gen de MRP, ya que en INER-37 se observó un ligero aumento en el transcrito al pasar de monocapa a microesférula (Figura 14, carriles 3 y 4), pero INER-51.0 no encontró transcrito en ningún tipo de cultivo. (Figura 14, carriles 7 y 8).

En la figura 15 se observa que la expresión de GST- μ en INER-37 fue positiva e independiente del tipo de cultivo (Figura 15, carriles 1 y 2), mientras que en INER-51.0 no se expresó este gen bajo ninguna condición (Figura 15 carriles 5 y 6). En cambio, el gen de Topo I se expresó como un gen constitutivo en todos los tipos de cultivo y para ambas células (Figura 15 carriles 3, 4, 7 y 8).

La expresión de los oncogenes p53 y Bcl-2 también fue diferente en cada tipo celular, aún en condiciones de cultivo 2D. En el caso de INER-37, la expresión de p53 incrementó en los cultivos 3D, pero en INER-51.0, no se observó expresión para este gen (Figura 16, carriles 2,3 y 6,7 respectivamente). Para Bcl-2 en cambio, los resultados mostraron que INER-37 presentó un transcrito de 700 pb, el cual fue 300 pb mayor al esperado (392 pb). La expresión de este fragmento no cambió con el tipo de cultivo (Figura 16, carriles 4 y 5). En caso de INER-51.0, se observó un transcrito del tamaño esperado, pero la intensidad de la banda fue tenue y no mostró cambios por el cultivo (Figura 16, carriles 8 y 9).

Con la finalidad de determinar si las alteraciones en la expresión de algunos genes correspondían con cambios en la expresión de proteínas, se realizó un gel de SDS-PAGE para los diferentes tipos de cultivo. Los resultados mostraron que las dos células produjeron distintos tipos de proteínas según la forma en que fueron cultivadas. Las proteínas

observadas en el gel, dependieron de los detergentes utilizados para su aislamiento. Así, cuando se uso Tritón X100, el patrón electroforético de INER-37 en cultivo 2D mostró múltiples bandas, mientras que en el caso de cultivos 3D el patrón de bandas fue diferente con representantes de menor peso molecular y una banda sobresaliente de aproximadamente 45 kDa. (Figura 17, carriles 2 y 3). Para las proteínas obtenidas con Tritón X-100 en INER-51.0 en cultivo 2D se observó una banda bien definida de aproximadamente 40 kDa, que no apareció en los cultivos 3D (Figura 17, carriles 4 y 5). Cuando las proteínas fueron extraídas con el detergente RIPA (SDS; NP-40 y deoxicolato de sodio), el patrón de proteínas de INER-37 cambio completamente, con más bandas para los cultivos 3D en comparación con las que aparecieron en los cultivos 2D y en este último caso, con una banda muy evidente de 45 kDa que no apareció en los cultivos 3D (Figura 17, carriles 6 y 7).

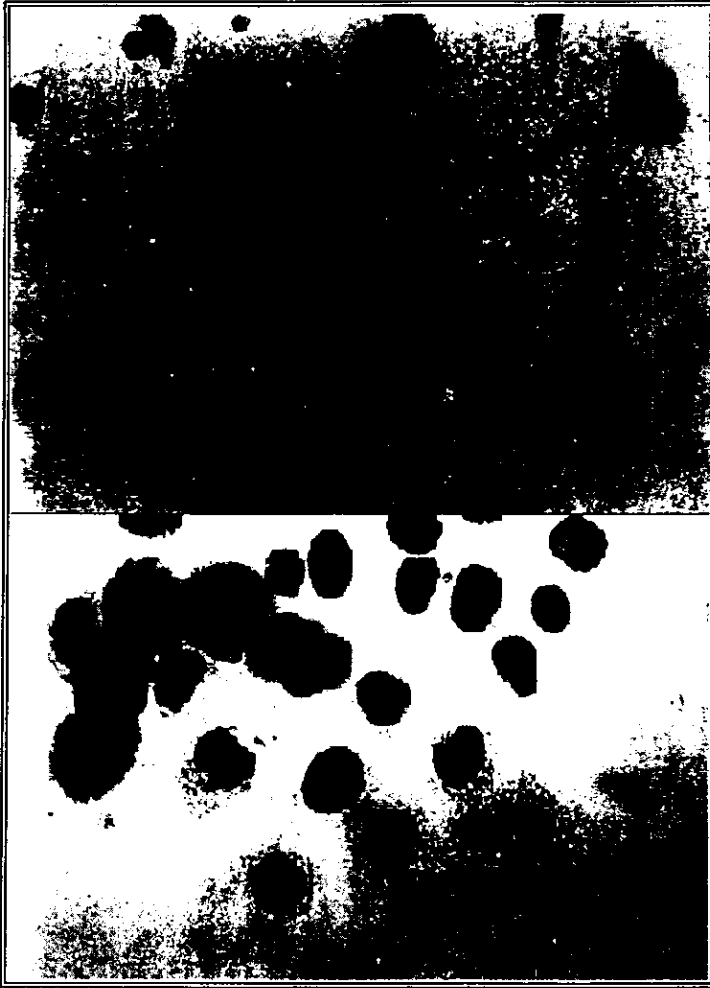


Figura 3. Microfotografías de las líneas celulares teñidas con PAS. A) muestra células positivas de INER-37; B) células INER-510 negativa para la tinción. Aumento total de 400X

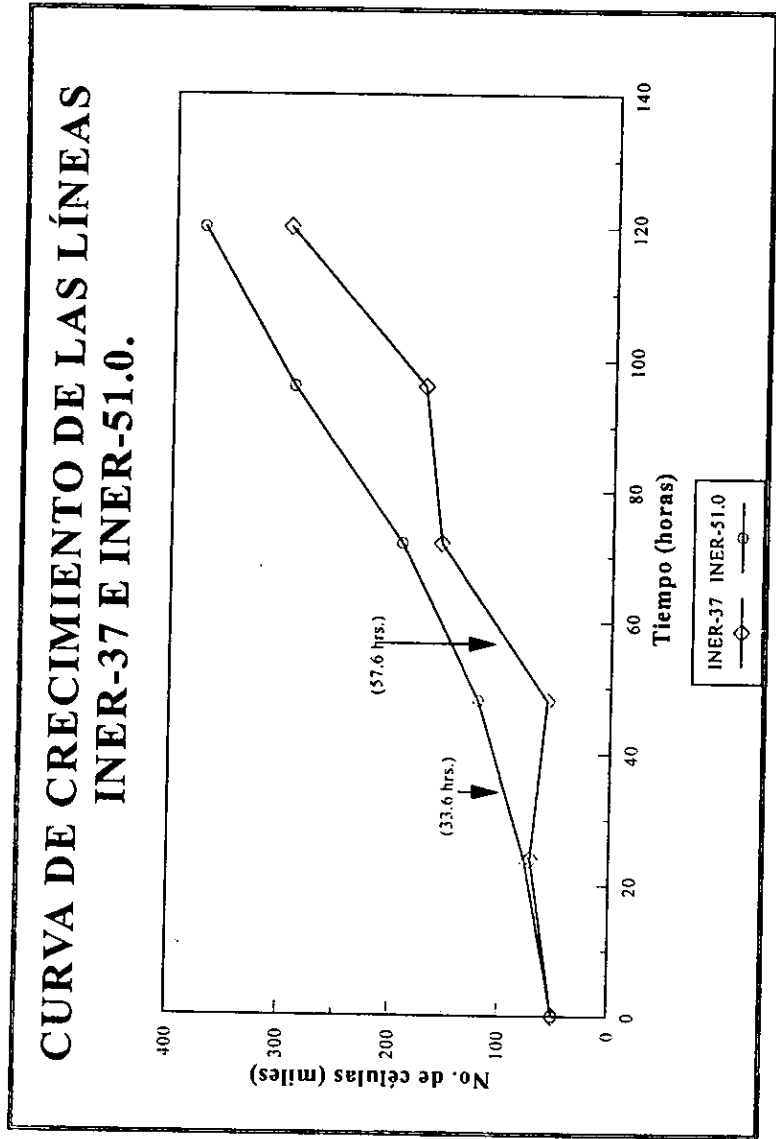


Figura 4. Curva de crecimiento celular de las líneas INER-37 e INER-51.0. La línea INER-37 (◊) tiene un tipo de crecimiento irregular, mientras que la línea INER-51.0 (○) tiene un tipo de crecimiento exponencial.

ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS PROTEICA EN CULTIVOS BIDIMENSIONALES

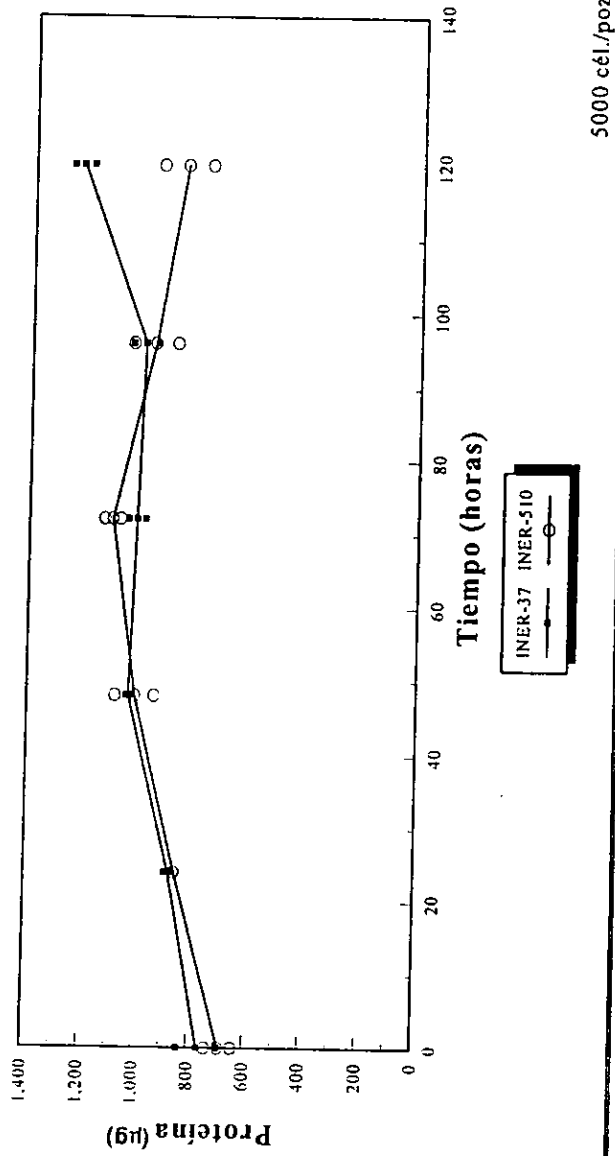


Figura 5. Análisis de la síntesis de proteína total a través del tiempo de cultivo en monocapa para las líneas INER-37 (■) e INER-510 (○).

ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS PROTEICA EN CULTIVO TRIDIMENSIONAL

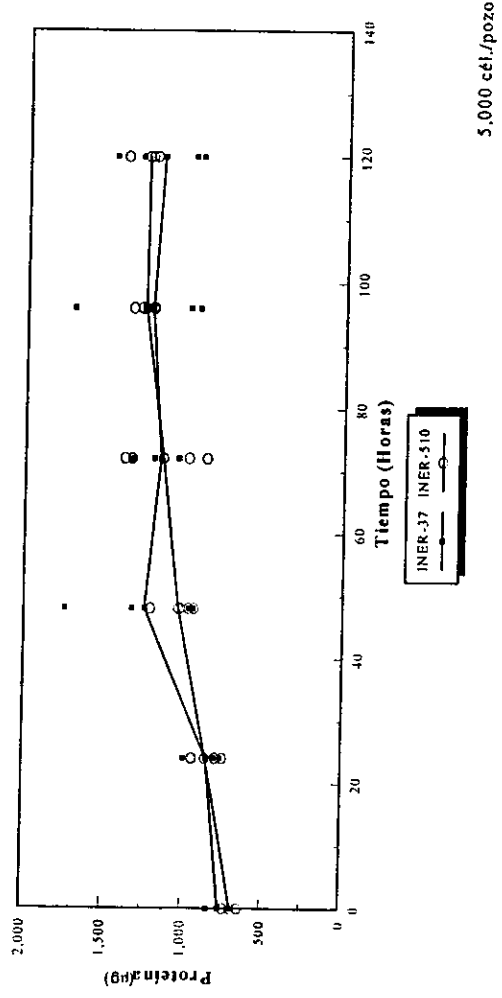


Figura 6. Análisis de la síntesis de proteína total a través del tiempo de cultivo tridimensional para las líneas INER-37 (■) e INER-510 (○).

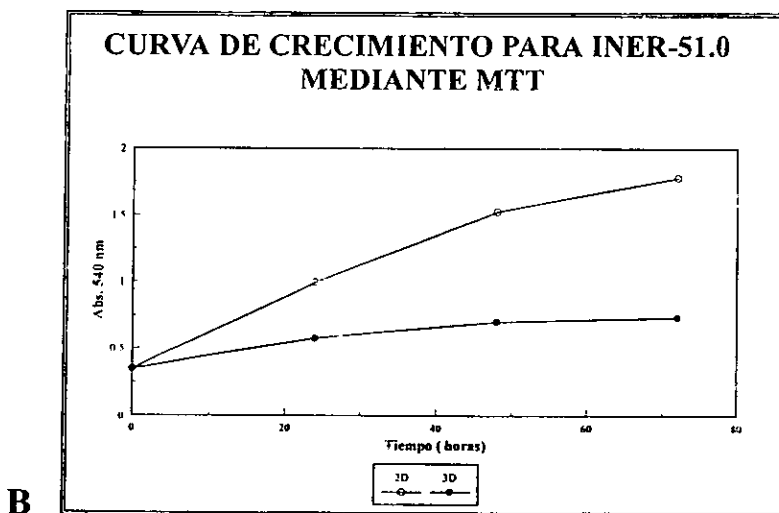
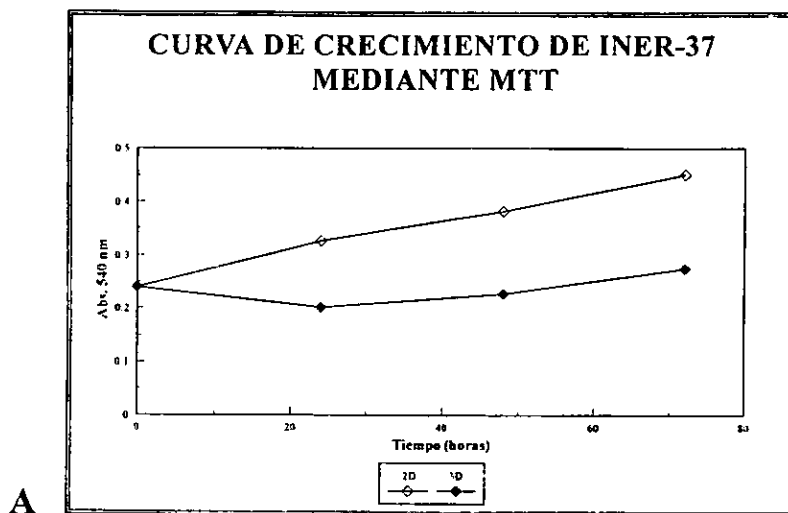


Figura 7. Curvas de crecimiento de las líneas celulares A) INER-37(\diamond y \blacklozenge) y B) INER-51.0 (\circ y \bullet) mediante el ensayo de MTT.

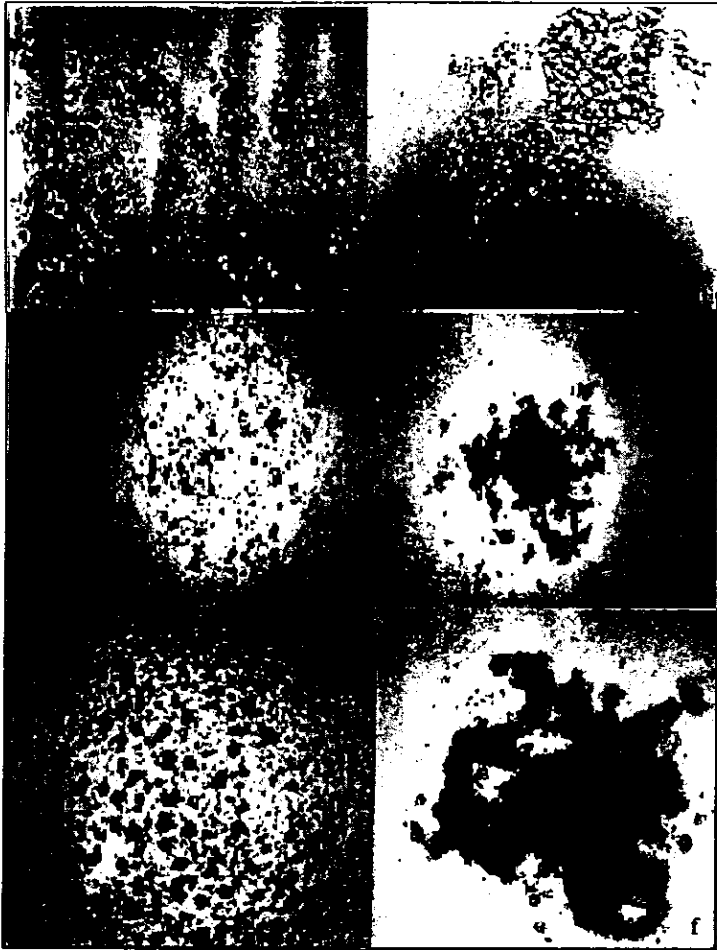


Figura 8. Etapas del crecimiento celular en cultivos 3D para las líneas celulares INER-37 (izquierda) e INER-51.0 (derecha). Los cambios morfológicos y el incremento en el volumen esférico son evidentes en poco tiempo de cultivo (24 hrs.), como se observa en *a* y en *b* (400X), las células comienzan rápidamente a agruparse. En las figuras *b*, *e*, *c* y *f* (100X) se puede observar el aumento en las microesférulas en relación al tiempo (48 y 72 hrs. respectivamente). Las microesférulas obtenidas a 72 hrs. en cultivos 3D para INER-37 (*c*) fueron de menor tamaño de las que se presentaron en INER-51.0 (*f*).



Figura 9. Análisis histológico los cultivos 3D de INER-37 teñidos con H/E. Se observa una unión muy estrecha entre las células formando un tejido compacto, que no permiten la formación de espacios intercelulares. Recuadros a y b muestran una imagen semejante a un tejido (100 X), mientras que en c y d se observan detalles del tejido (400 X).

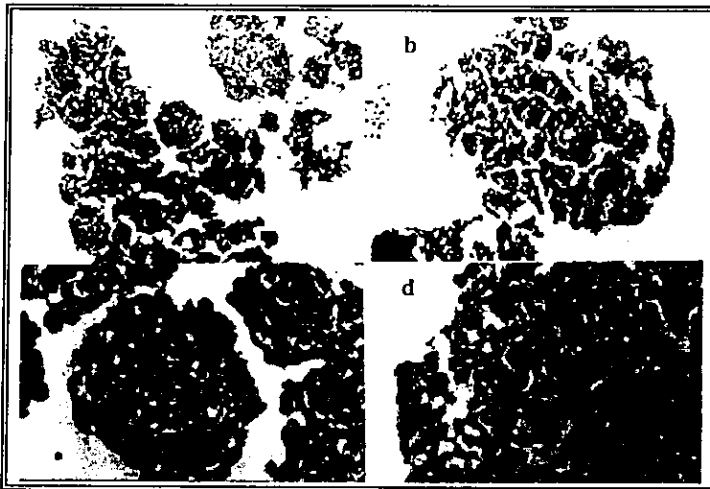


Figura 9'. Análisis histológico los cultivos 3D de INER-51.0 teñidos con H/E. Se observa una unión laxa entre las células formando un tejido menos compacto, en cual existen numerosos espacios intercelulares que permiten el libre transito de los nutrientes. Recuadros a y b muestran racimos multicelulares (100 X), mientras que en c y d se observan los grandes espacios de comunicación que existen entre los racimos (400 X).

TABLA V. Valores de IC₅₀ para las líneas INER-37 e INER-51.0 al exponerse a diferentes fármacos en cultivos en monocapa y tridimensionales.

FÁRMACO	INER-37 2D (μM)	INER-37 3D (μM)	INER-51 2D (μM)	INER-51 3D (μM)
VP-16				
Exp. 1	1.5	>500	2	>500
Exp. 2	15	>500	2.1	>500
Exp. 3	70		4.2	
Exp. 4	200			
Exp. 5	220			
Exp. 6	240			
VM-26				
Exp. 1	0.15	>500	0.25	>500
Exp. 2	5	>500	0.6	>500
Exp. 3	8		1.9	>100
Exp. 4	8.7			
Exp. 5	11			
Exp. 6	22			
Exp. 7	45			
DXR				
Exp. 1	0.6	>100	3	>100
Exp. 2	1	>100	7	>100
Exp. 3	1.5		4.8	62
Exp. 4	2		9.2	
Exp. 5	10			
CPT				
Exp. 1	0.1	>100	0.19	>100
Exp. 2	2	>100	0.48	>100
Exp. 3	6			
Exp. 4	18			
Exp. 5	32			
5-FU				
Exp. 1	>100	>>500	0.5	>>500
Exp. 2	>500		1	
MTX				
Exp. 1	>100	>>500	0.4	>>500
Exp. 2	>500		2.8	
ARA-C				
Exp. 1	>100	>>500	0.30	>>500
Exp. 2	>500		0.48	

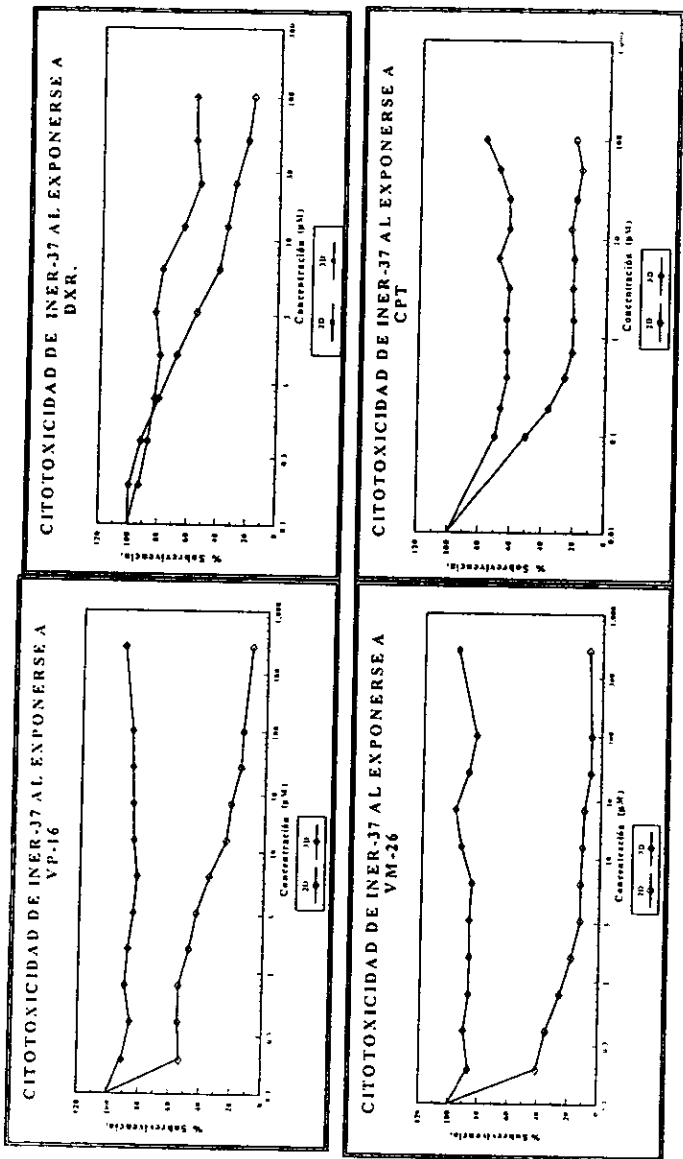


Figura 10. Curvas de sensibilidad a fármacos de la línea INER-37 al exponerse a diferentes concentraciones de VP-16, DXR, VM-26 y CPT en cultivos 2D(○) o 3D(●). En todos los casos se observa un aumento en la resistencia a fármacos por los cultivos 3D.

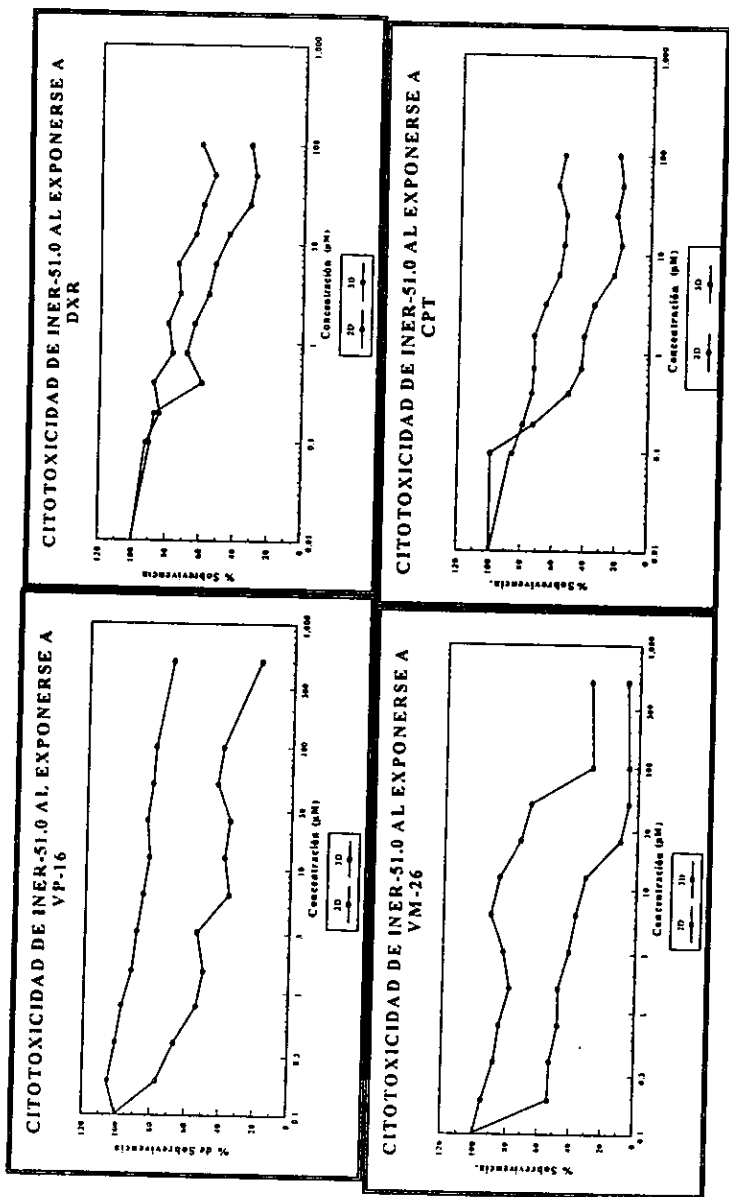


Figura 11. Curvas de sensibilidad a fármacos de la línea INER-51.0 al exponerse a VP-16, DXR, VM-26 y CPT en cultivos 2D(○) o 3D(●). En todos los casos se observa un aumento en la resistencia a fármacos por los cultivos 3D.

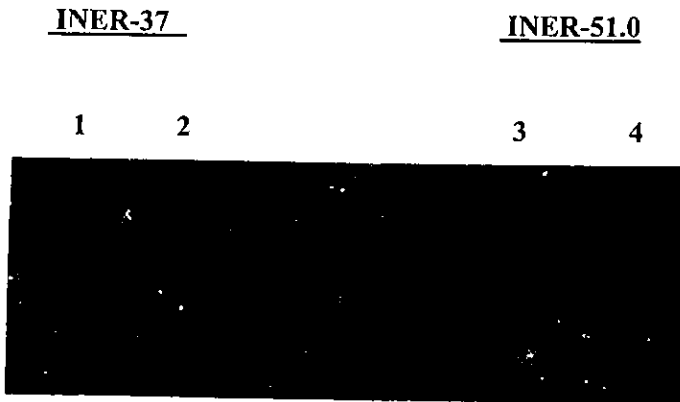


Figura 12. Análisis por RT-PCR de la expresión del gen constitutivo G3PDH a partir de muestras obtenidas de INER-37 e INER-51.0 en cultivos 2D y 3D. Carriles 1 y 3 monocapa (2D), 2 y 4 tridimensional (3D).

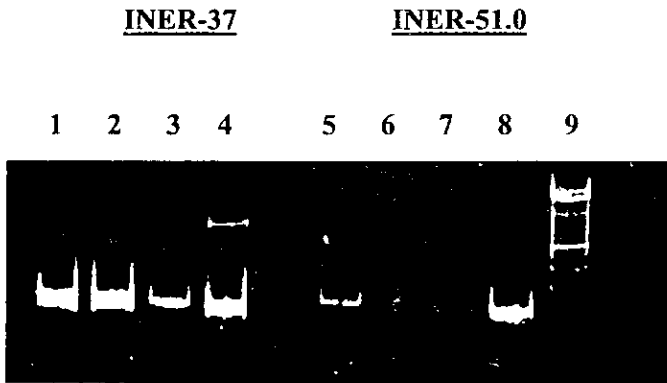


Figura 13. Análisis por RT-PCR de Topo II α y Topo II β para las líneas celulares INER-37 e INER-51.0 en cultivos 2D y 3D. Carriles 1,5 (2D) y 2,6 (3D), expresión de Topo II α ; carriles 3,7 (2D) y 4,8 (3D), expresión de Topo II β ; carril 9, marcadores de peso (100 pb).

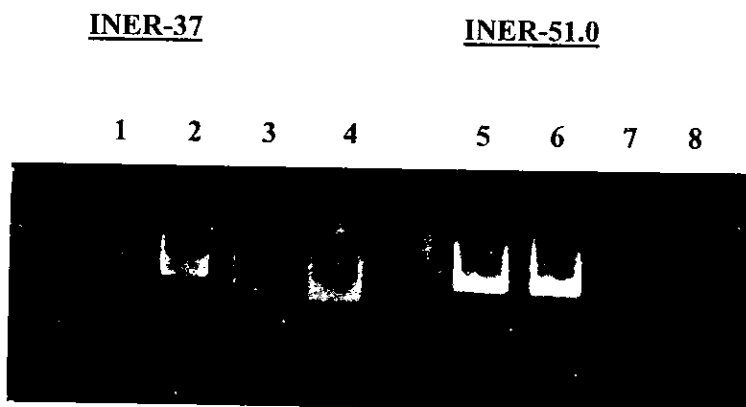


Figura 14. Análisis por RT-PCR de MDR-1 y MRP para las líneas celulares INER-37 e INER-51.0 en cultivos 2D y 3D. Carriles 1,5 (2D) y 2,6 (3D) expresión de MDR-1; carriles 3, 7 (2D) y 4,8 (3D) expresión de MRP.

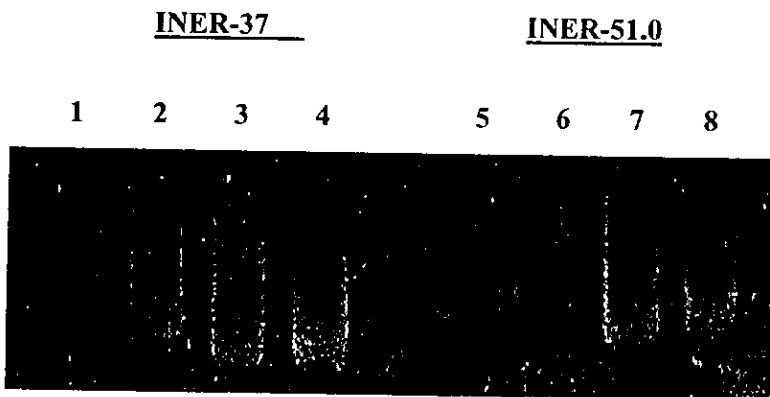


Figura 15. Análisis por RT-PCR de GST- μ y Topo I para las líneas celulares INER-37 e INER-51.0 en cultivos 2D y 3D. Carriles 1,5 (2D) y 2,6 (3D), expresión de GST- μ ; carriles 3,7 (2D) y 4,8 (3D), expresión de Topo I.

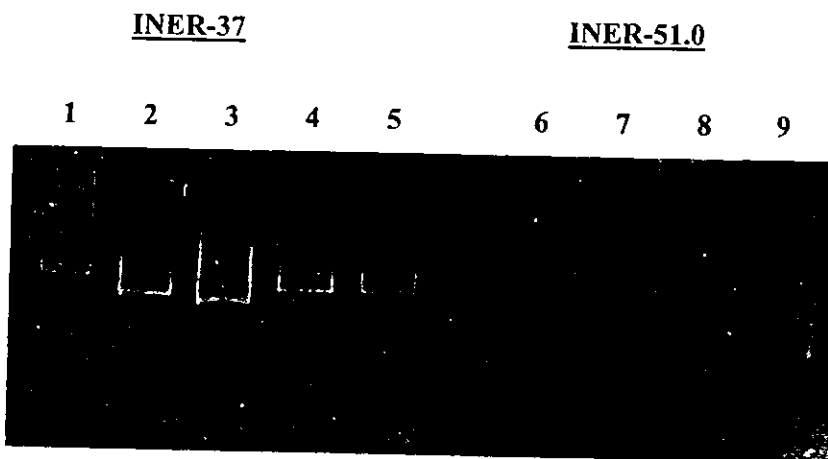


Figura 16. Análisis por RT-PCR de los oncogenes p53 y Bcl-2 para las líneas celulares INER-37 e INER-51.0 en cultivos 2D y 3D. Carril 1, marcadores de peso; carriles 2,6 (2D) y 3,7 (3D), expresión de p53; carriles 4,8 (2D) y 5,9 (3D), expresión de Bcl-2. INER-37 presenta un transcrito para Bcl-2 con 300 pb adicionales.



Figura 17. Análisis por SDS-PAGE de proteínas obtenidas de las células INER-37 e INER-51.0. Las proteínas de INER-37 e INER-51.0 en cultivos 2D y 3D fueron extraídas con tritón X-100 ,carriles 2,3,4 y 5, respectivamente y con RIPA para INER-37, carriles 6 y 7.

Los tumores del pulmón presentan una resistencia innata a la quimioterapia. Por esta razón, existen una gran cantidad de estudios que tienen como finalidad tratar de identificar los mecanismos que permiten a estos tumores resistir la acción citotóxica de los fármacos. Sin embargo, la gran mayoría de los modelos utilizados han sido realizados en cultivos bidimensionales de células tumorales, por lo que muchas veces los resultados obtenidos son difíciles de extrapolar a los fenómenos *in vivo*. Así, resulta de gran importancia desarrollar modelos que se acerquen más a las condiciones reales de crecimiento de los tumores, siendo uno de estos modelos el crecimiento en cultivo tridimensional.

Con la finalidad de evitar que las células se adhirieran a la superficie de la caja y tuvieran una mayor interacción entre ellas, los cultivos tridimensionales fueron realizados con la ayuda de un colchón de agarosa. El uso de otro tipo de matrices, como polímeros de Sefadex o matriz extracelular de sarcoma murino, no dió los mismos resultados en cuanto al tamaño de las esférulas o fue muy costoso.

Los cultivos en colchón de agarosa mostraron que a pocas horas de siembra, las células formaron pequeños agregados celulares, a los cuales se iban uniendo más células, mismas que posteriormente comenzaron a dividirse, hasta formar una microesférula de más de 10 capas celulares. Al examinar cuidadosamente los cortes histológicos de estos cultivos, se observó que las células de INER-37 formaron un tejido semejante al que se observa en un corte de tejido obtenido por biopsias, identificándose algunos arreglos de tipo glandular y células con anillo de sello, característico de un adenocarcinoma. En el caso de INER-51.0 no se observaron sistemas de glándulas, pero es importante señalar que este tipo de células fueron identificadas como un adenocarcinoma poco diferenciado. El arreglo de las microesférulas en INER-51.0 fue mas laxo, por lo que se presentaron múltiples espacios intercelulares, en los cuales fue posible el libre tránsito de macromoléculas (nutrientes) hacia las capas celulares mas internas de la microesférula. La memoria que guardan las células sobre el tipo de tejido que les dio origen, no es particular de los tumores; Weaver y cols.^{20,54} realizaron cultivos 3D con epitelio de mama y encontraron la formación de estructuras glandulares.

Al estudiar el comportamiento de las líneas celulares tumorales en cultivos bidimensionales, se encontró que ambas líneas celulares presentaron patrones de proliferación diferentes. En el caso de las células INER-37, se observó un crecimiento discontinuo y lento, en comparación al crecimiento exponencial de las células INER-51.0. El patrón de crecimiento presentado por las células INER-37, fue muy parecido al crecimiento reportado para los tumores de pulmón (células no pequeñas) en condiciones *in vivo*. Para la INER-51.0, la velocidad de crecimiento fue mayor y esta característica puede estar relacionada con el grado de diferenciación y/o a la selección de una clona celular de alta proliferación al obtener la línea celular en condiciones de cultivo *in vitro*. En el caso de los tumores poco diferenciados, el índice de proliferación siempre es mayor en comparación con los bien diferenciados, por lo cual la quimioterapia tiene mayor posibilidad de éxito. Cabe destacar, que si bien la forma de crecimiento en cultivo 3D recuerda un poco el crecimiento de los tumores *in vivo*, las características de crecimiento de cada una de las líneas celulares son propias a cada una de ellas y no necesariamente son un reflejo del comportamiento del tumor.

Cuando se comparó la síntesis de proteína durante la proliferación entre los dos tipos de cultivos, se observó que a pesar de producirse la misma cantidad de proteína, las células mantenidas en cultivos 3D disminuyeron su tasa de proliferación. Estos resultados sugirieron que a pesar de disminuirse la tasa de división, las células continuaron produciendo grandes cantidades de proteínas, algunas de las cuales tal vez funcionen durante la comunicación o unión celular, o como proteínas de secreción, desintoxicación, etc.

El análisis de las proteínas sintetizadas por los diferentes tipos de cultivo, mostró una gran diferencia en la cantidad y tipo de proteínas. A pesar de que se desconoce si existe una expresión preferencial para proteínas, inducida por el tipo de cultivo (p.ej. proteínas de membrana), se tienen evidencias de que en otros sistemas de cultivo 3D, se presentan cambios en E-caderinas, α -cateninas y β -cateninas (las cuales interactúan durante la unión célula-célula) y cambios en las proteínas que forman la matriz.^{21,54} Al parecer, la expresión de estas proteínas de unión son necesarias para la estabilidad de las microesférulas. Sin

embargo, cabe la posibilidad de que otras proteínas con funciones diferentes también sean producidas.

Una vez conocida la velocidad de crecimiento celular y los cambios en la morfología dados por el cultivo 3D, se realizaron ensayos de citotoxicidad para determinar el grado de resistencia de las microesférulas a los diferentes fármacos. Los resultados mostraron que en ambas líneas celulares en cultivo 3D se incrementó enormemente la resistencia. Se observaron incrementos de más de 100-500 veces en el IC_{50} en comparación con los cultivos 2D. Los cambios en la velocidad de proliferación de los cultivos 3D y por lo tanto en el ciclo celular, fueron interesantes, pero muy probablemente, solo en parte son responsables de la alta resistencia observada.

En tumores *in vivo*, una explicación frecuente para el bajo o nulo efecto de la quimioterapia lo constituye el tamaño del tumor. Así, en tumores de más de 1 cm de diámetro, la posibilidad de que el fármaco llegue a las capas mas internas es baja y su actividad está en relación directa con el tamaño del tumor. En el presente estudio, una posibilidad para explicar el aumento en la resistencia hacia los fármacos lo constituyó el número de células que formaron las microesférulas, así como la compactación entre ellas. El análisis histológico de los cultivos 3D, evidenció que ninguna de las dos posibilidades fue correcta, ya que INER-37 presentó una gran compactación celular, pero el número de capas celulares no llegó a ser mayor de 10. Por el contrario, en INER-51.0 la compactación fue menor, con grandes espacios entre los racimos celulares formados solo por unas cuantas capas de células, que permitieron la libre comunicación intercelular. A través de estos espacios, los nutrientes pueden llegar a las células mas internas de la microesférula y por consiguiente también lo hacen los fármacos. Dos observaciones corroboraron esta hipótesis: 1) en los experimentos de proliferación con MTT, el sustrato una vez metabolizado tiñó de color azul intenso todas las células de la microesférula, la cual pudo ser observada sin ayuda del microscopio invertido y 2) experimentos de captación de DXR mostraron bajo el microscopio de epifluorescencia, que este fármaco fue captado por todas las células del cultivo 3D (datos no mostrados).

Cuando los genes de multiresistencia fueron analizados, se evidenciaron cambios en la expresión para varios de ellos. Se encontró que en el caso de INER-37 la expresión de Topo II α no fue modificada a pesar de que este gen y su producto son regulados a través del ciclo celular. En el caso de Topo II β , se observó un aumento en la expresión del transcrito en los cultivos 3D para ambos tipos de células.

A diferencia de Topo II α , la mayoría de las evidencias muestran que la expresión de Topo II β no es regulada a nivel del ciclo celular.^{28,39} Sin embargo, en nuestro modelo el aumento en la expresión de topoisomerasa II β en ambas líneas celulares sugiere alguna dependencia del ciclo. En sistemas de cultivo 2D, los cambios en la expresión de las topoisomerasas II durante el ciclo celular son conocidos, así en células ALL-C los niveles de Topo II α correlacionan con el porcentaje de células en las fases S y G₂/M, mientras que la expresión de Topo II β parece variar en relación con las células en fase G₁.³⁹ Sin embargo, nuestros resultados son más parecidos a los reportados por Drake y col.⁴⁰ quienes en cultivo 3D encontraron un aumento en los niveles de Topo II β y una disminución en los niveles de Topo II α , ambos asociados con un estado de quiescencia. En nuestro caso, la disminución de la proliferación en 3D también sugiere que parte de las células en la microesférula entran en un estado de quiescencia, no obstante, el aumento en el transcrito de Topo II β y probablemente su producto, no explica la falta de actividad de los fármacos que actúan como inhibidores de estas enzimas.

La falta de expresión de Topo II α en INER-51.0 podría explicar en parte el aumento en la resistencia a fármacos, pero no lo haría en el caso de INER-37. En esta última línea celular, se han encontrado alteraciones en la localización de Topo II α (citoplásmica), por lo que es posible que también esté afectada su regulación.⁴⁷ Por el contrario, el aumento para Topo II β en los cultivos 3D podría substituir parte de las funciones perdidas de Topo II α en INER-51.0, pero este aumento también se traduciría en un mayor número de sitios blanco para la unión del fármaco y una mayor posibilidad de muerte celular.

Cabe señalar, que la translocación de las topoisomerasas hacia el núcleo (para que lleven a cabo su función), depende de modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación, etc.), mismas que también dependen de las fases del ciclo y en este sentido se desconoce si existen cambios que modifiquen la sensibilidad de estas enzimas a los fármacos.^{28,39,55}

Al estudiar la expresión de los genes que codifican para las proteínas de desintoxicación (MDR-1 y MRP) se observó un aumento en la expresión de ambos transcritos para INER-37 en cultivos 3D. En INER-51.0, el fenómeno fue completamente diferente, ya que no se encontraron modificaciones en la cantidad de transcrito para MDR-1, mientras que MRP no fue expresado en ningún tipo de cultivo. El aumento en la cantidad de MDR-1 y MRP en INER-37 podría estar relacionado con los cambios producidos por las interacciones celulares al formarse las microesférulas, pero existe también la posibilidad de que obedezcan a señales producidas durante la alteración del ciclo celular. Es posible que la formación de las microesférulas provoque la activación de proteínas de estrés, tales como HSP-70 y otras como p53. Ambas proteínas actúan como reguladores positivos de transcripción de MDR-1. Sin embargo, lo contrario pasa con MRP, ya que este gen es negativamente regulado a nivel transcripcional por p53.¹⁰ Si la regulación de MDR-1 en INER-37 se presenta por una mayor actividad de p53, esto explicaría en parte el aumento en el transcrito de p53 en los cultivos 3D. De igual manera, la baja expresión de p53 en INER-51.0 explicaría sólo en parte la falta de regulación de la expresión de MDR-1.

Se sabe que la gran mayoría de los tumores presentan mutaciones en p53, las cuales se distribuyen a lo largo de varios exones.^{10,63} En el caso de INER-37, la proteína p53 fue identificada por medio de inmunohistoquímica con anticuerpos que reconocen p53 mutado. A pesar de que no existen evidencias de que p53 mutado regule positivamente a MRP, esta posibilidad no puede ser descartada, pero el papel real que desempeña p53 en la regulación génica de INER-37 es difícil de explicar.

En líneas celulares resistentes a drogas, se ha asociado la presencia de p53 con una disminución en la sensibilidad a fármacos.^{56,57,58} En este caso, esta asociación sólo es posible en INER-37 pero no en INER-51.0.

En INER-37, el aumento en la expresión de los transcritos de MDR-1 y MRP podría explicar el aumento en la resistencia de estas células, pero en INER-51.0 la expresión de MDR-1 en cultivo 2D y alta sensibilidad a fármacos, sugiere una alteración en la función de la proteína. Es posible entonces, que en INER-51.0 la gp-P no este activa, ya sea por una localización celular diferente o bien por que requiera una modificación postraducciona.

Se ha reportado que la gp-P puede ser localizada en compartimentos diferentes a la membrana plasmática, tales como el complejo del Golgi.^{59,60} Por el momento se desconoce el mecanismo por el cual la gp-P se encuentra en un compartimento subcelular distinto y el impacto en la resistencia a fármacos. Si en INER-51.0 este fuera el caso, parecería que gp-P no tiene una función muy relevante en el mecanismo de resistencia, pero esto cambia cuando son cultivadas en forma de microesférulas. El comportamiento atípico de gp-P en los diferentes cultivos no es particular de este tipo de modelos, ya que existen varias observaciones en los que la presencia o ausencia de gp-P en tumores sólidos (p.ej. Ca. mama) no se relaciona con un fenotipo de multiresistencia.

Varios de los mecanismos que confieren resistencia a fármacos parecen estar íntimamente relacionados. Uno de los más conocidos es la interacción entre las enzimas GST y la proteína MRP.⁶¹ Las GST pueden alterar químicamente varios tipos de fármacos, para servir como sustratos a MRP y ser expulsados de la célula. Este mecanismo parece estar relacionado con la actividad propia de desintoxicación y secreción de sustancias tóxicas en varios tipos de tejido tumoral (adenoma de pulmón) y normal (hígado, mama, riñón, vejiga, colon).^{49,62}

En las células H69/DX, la resistencia a DXR parece estar asociada a un incremento de 10 veces en la concentración de GST- π y a un incremento en el transporte de los conjugados de glutatión (GS-X) a través de la bomba de membrana MRP/GS-X.^{48,61}

En el caso de INER-37 la coexpresión de GST- μ y MRP parece ayudar al aumento en la resistencia a DXR y tal vez a CCDP y Melfalan (estos dos últimos aún no estudiados). Sin embargo, dado que aún se desconoce mucho sobre la interacción de estos dos sistemas y debido a que sólo se analizó la expresión de GST- μ , es posible que en cultivo 3D también se activen algunos otros miembros de la familia GST, lo cual produzca un mayor número de compuestos conjugados con glutatión, mismos que serán eliminados a través de MRF.

El tamaño de la esférula también parece influir en las concentraciones de glutatión (GSH). Romero y cols.⁶³ encontraron que la concentración de GSH fue dependiente del tamaño de la esfera, la actividad de proliferación y el ciclo celular. En INER-37 e INER-51.0, las concentraciones de GSH aún no han sido evaluadas.

La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-x1 puede incrementar la resistencia relativa a agentes anticancerosos.⁶⁴ En este trabajo, el análisis de la expresión de Bcl-2 en las líneas celulares resulta difícil de interpretar, por lo cual es necesario llevar a cabo un análisis más profundo y estudiar otros miembros de la familia de Bcl-2.

Debido a que los procesos celulares inducidos por el cultivo 3D son sumamente complejos, no es posible explicar el aumento en la resistencia múltiple como el resultado de un solo mecanismo y sí como la suma de varios mecanismos interrelacionados.

De esta manera, la inhibición del ciclo celular o estado de quiescencia solo explica en parte el aumento de la resistencia a los fármacos que tiene actividad sobre una fase específica del ciclo celular. Probablemente, la interacción estrecha entre las células en cultivo 3D, activa las cascadas de transducción de señales que a través de cinasas provocan la activación de diferentes rutas bioquímicas de desintoxicación, tales como la actividad de GST, DHFR, HPRT y la activación de bombas (gp-P y MRP). Inoue⁶⁵ reportó que los cambios en la resistencia a fármacos en cultivos 3D pueden asociarse con varios parámetros, como: contactos intercelulares, heterogeneidad en la cinética celular, hipoxia crónica, y malnutrición en las células en el centro de la microesférula. En nuestro modelo, los cultivos 3D produjeron un aumento de la población de células en fase G₁ (datos no mostrados) sin que al parecer se presentara una falta de nutrientes o elevación en el pH. Por otra parte, el análisis en la expresión de genes de multiresistencia mostró cambios importantes. Rak y cols⁶⁶, también observaron que la expresión de c-H-ras y posiblemente su función puede ser significativamente alterada. Sin embargo, es importante señalar que en conjunto, los cambios en la expresión de genes de multiresistencia no ayudan a explicar el aumento en la resistencia a fármacos en las dos líneas celulares. Así, la existencia de un mecanismo único que confiere resistencia en los cultivos 3D, no parece ser posible por el momento, por lo que cada célula parece desarrollar diferentes mecanismos que unidos le permiten resistir la actividad citotóxica de los fármacos.

El modelo de crecimiento de tumores a través de microesférulas resulta importante para comprender los procesos celulares que se llevan a cabo cuando existe un íntimo

contacto entre las células y se acerca mucho a los eventos que suceden durante las primeras fases de crecimiento avascular de los tumores. Además, este tipo de modelo permite conocer más sobre los mecanismos que gobiernan la proliferación celular, la velocidad con la que las células transitan por el ciclo y los cambios necesarios para que éstas puedan sobrevivir como una masa tumoral. Por otra parte, el estudio de la actividad de fármacos en cultivos 3D, da la pauta para iniciar nuevas investigaciones y el desarrollo de compuestos con mayor actividad citotóxica, que no sean contrarrestados por los mecanismos de multiresistencia. Este conocimiento permitirá dar una alternativa al arsenal quimioterapéutico utilizado en la lucha contra el cáncer, que por el momento es la enfermedad responsable de un gran número de muertes en todo el mundo.

VIII CONCLUSIONES

- ◆ El estado de quiescencia celular es uno de los mecanismos celulares importantes para conferir el fenotipo de resistencia.
- ◆ El cambio en los patrones de crecimiento celular provoca que se dé una regulación génica diferencial que puede estar directamente relacionada con el fenómeno de resistencia múltiple.
- ◆ El fenotipo de resistencia a múltiples drogas no depende de un proceso o cambio único, la complejidad de los procesos celulares se asocia con una cantidad de eventos que dan como resultado este fenotipo.
- ◆ Es posible que dos células con características diferentes converjan en un mismo fenómeno, en este caso mediante procesos diferentes, las líneas INER-37 e INER-51.0 presentan resistencia a múltiples drogas.
- ◆ El modelo de cultivo tridimensional sí proporciona un acercamiento hacia el comportamiento *in vivo* de los tumores.

IX. ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARA-C:	Arabinócido de citosina.
ARN:	Ácido ribonucleico
ASF	Amortiguador salino de Fosfatos
CCNP:	Carcinoma de Células No Pequeñas.
CCP:	Carcinoma de Células Pequeñas.
CPT:	Camptotecina
Cultivos 2D:	Cultivos en monocapa
Cultivos 3D:	Cultivos tridimensionales.
DXR:	Doxorubicina
5FU:	5-fluorouracilo
GHS:	Glutación
gp-P:	Glicoproteína-P
GST:	Transferasa-S de Glutación
IC ₅₀ :	Índice de citotoxicidad media.
MRP:	Proteína de Resistencia Múltiple
MTT:	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-bromuro de difenil-tetrazolium.
MTX:	Metotrexato
RT-PCR:	Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa.
Topo II α :	Topoisomerasa II α
Topo II β :	Topoisomerasa II β
VM-26:	Tenipósido
VP-16:	Etopósido

X. SOLUCIONES

a) Solución salina de fosfatos (ASF).

NaCl	8mM
KCl	2mM
Na ₂ HPO ₄	1.5mM
KH ₂ PO ₄	2.4mM
H ₂ O	1L

b) Amortiguador salino de Tris (TBS)

NaCl	58mMg
KCl	74.57mM
Tris	25mM pH 7.4

c) Amortiguador Tris-borato (TBE)

Tris borato	0.1M pH 8.3
EDTA	2mM

d) Amortiguador de PCR

MgCl ₂	1.5mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20mM
Tris-HCl	75mM pH 9.0
Tween	0.1%

e) Detergente RIPA

Tris*Cl	50mM pH 7.5
NaCl	150mM
Nonide P-40	1%
Desoxicolato de sodio	0.5%
SDS	0.1%

f) Amortiguador de lisis (Tritón X100)

Tris*Cl	50mM pH 8
NaCl	50nM
PMSF	100µg/ml
Tritón X100	1%

1. Cooper G.. Elements of human cancer. Jhones and Bartlett Publishers. 1ªEd. USA. pp.354. 1992
2. Cortinas C.. Cáncer: herencia y ambiente. La ciencia desde México. 1ªEd. México. pp.96. 1990
3. Müller K.M. Lung cancer: morphology . En Respiratory and monograph carcinoma of the lung. Editado por: Spiro S.G. Eur Respir Mon 1(1): 50-71. 1995.
4. Schottenfled D. Epidemiology of Lung Cancer. En Lung Cancer.Principles and Practice. Pass H.I., Mitchel J.B., Johnson D.H. y Turrisi. A.T. Lippincott-Raven Publishers, 1ª Ed. Philadelphia. pág. 305-319. 1996.
5. Medina F.M., Barrera R.R., Morales J.F., Echegoyen R.C., Chavarría J.G. y Reborá. F.T. Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. Lung Cancer.. 14: 185-193. 1996.
6. van Zandwijk N. Aetiology and prevention of lung cancer. En Respiratory and monograph carcinoma of the lung. Editado por: Spiro S.G. Eur Respir Mon 1(1):18-49. 1995
7. Roth J.A., Cox J.D. y Hong. W.K. Lung Cancer. Blackwell. Scientific Publications. 1ª Ed. Boston. pp401. 1993.
8. Thun M.J. Mixed progress against lung cancer. Tobacco Control. 7:223-226. 1998.
9. Sherbet G.V. y Lakshmi. M.S. The genetics of Cancer. Genes associated with cancer invasion, metastasis and cell proliferation. Academic Press. 1ª Ed. USA. Pp338. 1997
10. Hussain S.P. y Harris. C.C. Molecular Epidemiology of Human Cancer: Contribution of Mutation Spectra Studies of Tumor Suppresor Genes. Cancer Res. 58: 4023-4037. 1998.
11. King. RJB. Cancer Biology. Longman 1ª Ed. Singapore. pp227. 1997
12. Cavenee W.K. y White. R.L. Bases genéticas del cáncer. Investigación y Ciencia. May: 44-51. 1995.
13. Lederman J.A. y Ormadel. D. The biology of lung cancer. En Respiratory and monograph carcinoma of the lung. Editado por Spiro S.G. Eur Respir Mon 1(1):72-90. 1995.
14. Oie H.K. y Gazdar. A.F. Initiation of cell cultures from lung tumor biopsies. En Lung Cancer. Principles and Practice. Editado por Pass H.I., Mitchel J.B., Johnson D.H. y Turrisi. A.T.. Lippincott-Raven Publishers, 1ª Ed. Philadelphia. pág. 151-160. 1996.

15. Gazdar A.F. y Carbone. D.P. The biology and molecular genetics of lung cancer.. RG Landes Company. 1ª Ed. USA Pp142. 1994.
16. Hoffman RM. To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question. Stem Cells. 11(2): 105-11. 1993.
17. Kunz-Schughart L.A., Kreutz M. y Kneuechel. R. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture systems to study tumor biology. Int J Exp Path 79:1-23. 1998.
18. Kunz-Schughart L.A., Groebe K. y Mueller-Klieser. W. Three-dimensional cell culture induces novel proliferative and metabolic alterations associated with oncogenic transformation. Int J Cancer. 66: 578-586. 1996.
19. Kneuechel R., Keng P., Hofstaedter F., Langmuir V., Sutherland R.M. y Penney. D.P. Differentiation patterns in two- and three-dimensional culture systems of human squamous carcinoma cell lines. Am J Pathol. 137(3): 725-736. 1990.
20. Weaver V.M., Fischer A.H., Peterson O.W. y Bissell. M.J. The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay. Biochem Cell Biol. 74: 833-851. 1996.
21. Byers S.W., Sommers C.L., Hoxter B., Mercurio A.M. y Tozeren. A. Role of E-caderin in the response of tumour cell aggregates to lymphatic, venous and arterial flow. Measurement of cell-cell adhesion strength. J Cell Sci. 108: 2053-2064. 1995
22. Sutherland R.M. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. Science 240: 177-184. 1988
23. De Vita V.T., Hellman S. y Rosemberg. S.A. Cancer Principles and Practice of oncology. 1ª ed. USA. pág.358-360. 1993.
24. Lazo J.S. y Larner. J.M. Individual Antineoplastic Drugs. En Human Pharmacology. Molecular to clinical. Editado por Brody T.M., Larner J., Minneman K.P. y Neu. H.C. Mosby. 2ª Ed. New York pág. 575-595. 1996.
25. Rajkumar S.V. v Adjei. A.A. A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapeutic agents in lung cancer. Cancer Treatment Rev. 24: 35-53. 1998.
26. Lizano-Soberón M. y Barrera-Rodríguez. R. Resistencia múltiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cáncer. Rev Invest Clin. 45:481-92. 1993.
27. Brown E. y Markman. M. Tumor chemosensitivity and chemoresistance assays. Cancer. 77(6): 1020-1026. 1996.

28. Cole S.P.C. Multidrug resistance in human lung cancer and topoisomerase II. En Lung Cancer. Principles and Practice. Editado por Pass H.I., Mitchel J.B., Johnson D.H. y Turrisi. A.T. Lippincott-Raven Publishers. 1ª Ed. Philadelphia. Pág.169-204. 1996.
29. Kerbel R.S., Kobayashi H. y Graham. C.H. Intrinsic or Acquired Drug Resistance and Metastasis: Are they linked phenotypes?. J Cellular Biochem. 56:37-47. 1994.
30. Gottesman M.M., Ambudkar S.V., Cornwell M.M., Pastan I. y Germann. U.A. Multidrug Resistance Transporter. En Molecular Biology of Membrane Transport Disorders. Editado por Schultz S.G., Andreoli T.E., Brown A.M., Fambrough D.M., Hoffman J.F. y Welsh. M.J. Plenum Press. 1ª Ed. New York. pág. 243-257. 1996.
31. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. Biophys Acta. 323: 466-483. 1973
32. Gazdar A.F., Bader S., Hung J., Kishimoto Y., Sekido Y., Sugio K., Virmani A., Fleming J., Carbone D.P. y Minna. J.D. Molecular Genetic Changes Found in Human Lung Cancer and Its Precursor Lesions. Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol. LIX: 565-572. 1994
33. Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Alquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M.V. y Deeley. R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science. 258: 1650-1654. 1992.
34. Coley H.M., Workman P. y Twentyman. P.R. Retention of activity by selected anthracyclines in a multidrug resistant human large cell lung carcinoma line without P-glycoprotein hyperexpression. Brit J Cancer. 63: 351-357. 1991.
35. Almquist K.C., Loe D.W., Hipfner D.R., Mackie J.E., Cole S.P.C. y R.G. Deeley. Characterization of de M_r 190 000 multidrug resistance protein (MRP) in Drug-selected and transfected human tumor cells. Cancer Res. 55: 102-110. 1995.
36. Berger W., Elbling L., Hauptmann E. y Micksche. M. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) and chemoresistance of human non-small-cell lung cancer cells. Int J Cancer. 73: 84-93. 1997.
37. Brock I., Hipfner D.R., Nielsen B.S., Jensen P.B., Deeley R.G., Cole S.P.C. y Sehested. M. Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and *mdr1* and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells. Cancer Res. 55: 459-462. 1995.
38. McLeod H.L., Douglas T., Oates M., Symonds R.P., Prakash D., van der Zee A.G.J., Kaye S.B., Brown R. y Keith. W.N. Topoisomerase I and II activity in human breast, cervix, lung and colon cancer. Int J Cancer. 59: 607-611. 1994.

39. Austin C.A. y Marsh. K.L. Eukaryotic DNA topoisomerase II β . *BioEssays*. 20:215-226. 1998.
40. Drake F.H., Hoffmann G.A., Bartus H.F., Mattern M.R., Crooke S.T. y Mirabelli. C.K. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry*. 28: 8154 -8160. 1989.
41. Sugimoto K., Yamada K., Egashira M., Yazaki Y., Hirai H., Kikuchi A. y Oshimi. K. Temporal and Spatial Distribution of DNA Topoisomerase II alters During Proliferation, Differentiation and Apoptosis in HL-60 cells. *Blood*. 91(4): 1407-1417. 1998.
42. Saleem A., Ibrahim N., Patel M., Li X-G., Gupta E., Mendoza J., Pantazis P. y Rubin. E.H. Mechanisms of Resistance in a Human Cell Line Exposed to Sequential Topoisomerase Poisoning. *Cancer Res*. 57:51.00-51.06. 1997.
43. Downes S.C., Clarke D.J., Mullinger A.M., Giménez-Abián J.F., Creighton A.M. y Jhonson. R.T. A topoisomerase II dependent G₂ cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature*. 372: 467-470. 1994.
44. Goswami P.C., Rotiroti J.L. y Hunt. C.R. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II α during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizin radiation. *Mol Cell Biol*. 16(4): 1500-1508. 1996.
45. D'Arpa P. y Liu. L.F. Topoisomerase-targetin antitumor drugs. *Biochimical et Biophysica Acta*. 989:163-177. 1989.
46. Feldhoff P.W., Mirski S.E.L., Cole S.P.C. y Sullivan. D.M. Altered subcellular distribution of Topoisomerase II α in a Drug-resistant human small cell lung cancer cell line. *Cancer Res*. 54:756-762. 1994.
47. Bautista de Lucio V.M. Localización citoplasmática de topoisomerasa II alfa en una línea celular humana de cáncer de pulmón. Tesis de licenciatura UNAM. 70pp. 1998.
48. Moscow J.A. y Dixon. K.H. Glutathione-related enzymes, glutathione and multidrug resistance. *Cytotechnology*. 12:155-170. 1993.
49. Di Ilio C. y Federici. G. Glutathione Transferase in Human Tumors and Human Cancer Cell Lines. En *Glutathione: metabolism and physiological functions*. Editado por Viña J. CRC press. 1ª Ed. USA Pág. 117-127. 1990.
50. Batist G., Tulpule A, Sinha B.K., Katki A.G., Myers C.E. y Cowan. K.H. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 261: 15544-15549. 1986.
51. Cole, S.P.C. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 17: 259-263. 1986.

52. Boudreau N., Werb Z. y Bissell. M.J. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *PNAS. USA.* 93: 3509-3513. 1996.
53. Wartenberg M., Frey C., Diederhagen H., Ritgen J., Hescheler J. y Sauer. H. Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer.* 75: 855-863. 1998.
54. Weaver V.M., Petersen O.W., Wang F., Larabell C.A., Briand P., Damsky C. y Bissell. M.J. Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three - Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *J.Cell Biol.* 137(1): 231-245. 1997.
55. Constantinou A., Henning-Chubb C. y Huberman. E. Novobiocin- and Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation of human Leukimia cells asociated with a reduction in Topoisomerase II activity. *Cancer Res.* 49: 1110-1117. 1989
56. Wang, Q. y Beck. W.T. Transcriptional Suppression of Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) gene expression by wild-Type p53. *Cancer Res.* 58:5762-5769. 1998.
57. Palazzo J.P., Kafka N.J., Grasso L., Chakrani F., Hanau C., Cuesta K.H. y Mercer. E. The role of p53, p21^{WAF1/CIP1}, and bcl-2 in radioresistant colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* 28(1): 1189-1195. 1997.
58. Konishi T., Lin Z., Fujino S., Kato H. y Mori. A. Association of p53 protein expression in stage I lung adenocarcinoma with reference to cytological subtypes. *Hum. Pathol.* 28: 544-548. 1997.
59. Molinari A., Cianfriglia M., Meschini S., Calcabrini A. y Arancia. G. P-glicoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug resistan cells *Int.J. Cancer.* 59: 789-795. 1994.
60. Molinari A., Calcabrini A., Meschini S., Stringaro A., Del Bufalo D., Cianfriglia M. y Arancia. G. Detection of P-Glicoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated Human Melanoma cells. *Int. J.Cancer.* 75: 885-893. 1998.
61. Lacave R., Coulet F., Ricci S, Touboul E, Flahault A., Rateau J.G., Cesari D., Lefrano J.P. y Bernaudin. J.F. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction MDR-1, MRP and GST-p gene expression in breast carcinomas. *Brit J Cancer.* 77(5): 694-702. 1998.
62. Viña J. Glutathione: metabolism and physiological functions. CRC press. 1ª Ed. USA. pp378. 1990

63. Romero F.J., Zukowski D. y Mueller-Klieser. W. Glutathione content of V79 cells in two- or three-dimensional culture. *Am. J. Physiol.* 272(5Pt1): C1507-12. 1997.
64. Lu Q-L., Abel P., Foster C. y Lalani. E.N. Bcl-2: Role in Epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum. Pathol.* 27(2): 102-110. 1996.
65. Inoue S., Takaoka K., Endo T., Mizuno S., Ogawa Y., Yoshida M. y Ohnuma. T. In vitro confirmation of newly established lung cancer cell lines using flow cytometry and multicellular tumor spheroids. *Lung Cancer.* 17: 85-101. 1997.
66. Rak J., Mitsuhashi Y., Erdos Y., Huang S., Filmus J. y Kerbel. R.S. Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *J Cell Biol.* 131(6): 1587-1598. 1995.