



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**RESISTENCIA MULTICELULAR ASOCIADA CON
GLICOPROTEÍNA-P EN UNA LÍNEA CELULAR DE
CÁNCER DE PULMÓN.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTORA EN CIENCIAS
EN EL AREA BIOMÉDICA
P R E S E N T A :
VALERIA PONCE DE LEÓN SUÁREZ

TUTOR: DR. GUILLERMO ALFARO MARTÍNEZ.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS...

Eclo 2:1-11, 18

in MEMORiam

A mis tutores: Dr. Guillermo Alfaro Martínez, Dr. Vicente Madrid Marina y Dr. Alfonso González Noriega, por su apoyo, ayuda, sus comentarios y la transmisión de tantos conocimientos que fortalecieron el desarrollo de este proyecto.

A mi madre Mirna Suárez y a mi hermana Marianna por TANTO amor, por su apoyo, su paciencia, su ayuda... ¡POR NO DEJAR DE CREER! Gracias Mary por impulsarme...

A Mirna por ser todo un reto en mi vida...

A Coke, Hash, Yayis, Anna y Jimy, POR SER UNA GRAN FAMILIA, por su enorme cariño y por compartir tanto.

A mi familia elegida mis grandes amigas que nunca me han dejado... gracias, Gracias, ¡¡GRACIAS!! Laura, Ma. Elena, H. Marce, Rashidi, Susanita y Ana Gabriela.

Mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y darme una formación académica y humana, por ser realmente “mi casa”.

Al CONACYT por el apoyo económico que me brindó, mediante la beca 153110, por medio de la cual puede dedicarme al desarrollo de este proyecto.

A la DEGEP por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y a Raúl Barrera Rodríguez por permitirme realizar el desarrollo experimental de este proyecto.

A todas esas personas que siempre me apoyaron personal, espiritual y académicamente a lo largo de este proyecto... ¡A LO LARGO DE TODA UNA VIDA!

INDICE

	Página
I. ABREVIATURAS	i
II. RESUMEN	ii
II.1 ABSTRACT	iii
III. INTRODUCCIÓN	1
III.1. IMPORTANCIA DEL CÁNCER COMO ENFERMEDAD MUNDIAL.	1
III.2. CÁNCER DE PULMÓN.	2
III.2.1 Etiología del cáncer de pulmón.	5
III.2.2 Cambios genéticos del cáncer de pulmón.	6
III.2.3 Clasificación del cáncer de pulmón.	6
III.2.4 Diagnóstico.	9
III.2.5 Estadio del cáncer de pulmón.	10
III.3. TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER DE PULMÓN.	11
III.3.1 Generalidades.	11
III.3.2 Quimioterapia.	13
III.4. RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS (<i>Multidrug Resistance</i> , MDR)	14

III.4.1	Proteínas de membrana relacionadas con la resistencia a fármacos.	19
III.4.2	Resistencia clásica a múltiples fármacos mediada por Glicoproteína-P (gp-P, ABCB1).	24
III.4.3	Familia de MRP (<i>Multidrug Resistance associated Protein</i>)	31
III.4.4	BCRP (<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>)	34
III.4.5	Resistencia a múltiples fármacos relacionada con diferentes mecanismos	35
III.4.5.1	Transferasas-S de Glutación (GST)	35
III.4.5.2	LRP/MVP (<i>Lung Resistance Protein/Major Vault Protein</i>)	37
III.4.6	Resistencia atípica a múltiples fármacos. Enzimas involucradas en la topología del DNA (Topoisomerasas de tipo I y II)	38
III.5	RESISTENCIA MULTICELULAR.	41
IV.	ANTECEDENTES DEL PROYECTO	44
V.	JUSTIFICACIÓN	47
VI.	HIPÓTESIS	48
VII.	OBJETIVOS	
VII.1.	OBJETIVO GENERAL	49
VII.2	OBJETIVOS PARTICULARES	

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	50
VIII.1 CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES	50
VIII.2 OBTENCION DE LA CLONA DE INER-51 CON FENOTIPO gp-P ^{neg} DENOMINADA I-51/PSC	50
VIII.3 CULTIVOS CELULARES	51
a) Cultivos en monocapa	
b) Cultivos en microesférulas	
VIII.4 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	52
VIII.5 ANÁLISIS POR RT-PCR	52
VIII.6 ANÁLISIS FUNCIONAL DE gp-P	53
a) Ensayo de retención de doxorrubicina	53
b) Ensayo de expulsión de doxorrubicina	54
c) Inhibición de la actividad de gp-P	54
d) Retención de rodamina 123	55
e) Retención de doxorrubicina con inhibidores de ATP.	55
VIII.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
IX. RESULTADOS	56
IX.1 RETENCIÓN DE DOXORRUBICINA EN CULTIVOS DE MICROESFERULAS	57
IX.2 ACTIVIDAD DE GLICOPROTEINA-P EVALUADA POR LA EXPULSIÓN DE FÁRMACO (DXR).	58
IX.3 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P.	59

IX.4	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P MEDIANTE LA RETENCIÓN DE RHODAMINA 123 EN CULTIVOS DE MICROESFÉRULAS.	59
IX.5	INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P POR AUSENCIA DE ATP.	61
IX.6	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE ATP, EL CUAL ESTÁ RELACIONADO CON LA EXPULSIÓN DE FÁRMACOS.	62
IX.7	¿LA AUSENCIA DE GLICOPROTEÍNA-P INFLUYE EN EL FENOTIPO DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS EN CULTIVOS DE MICROESFÉRULAS?	63
	a) OBTENCIÓN DE UNA CLONA CON FENOTIPO gp-P ^{neg}	63
IX.8	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD PARA LA CLONA I-51/PSC (gp-P ^{neg}).	65
IX.9	RETENCIÓN DE FÁRMACOS EN CULTIVOS DE MONOCAPA Y MICROESFÉRULAS EN LA CLONA I-51/PSC	65
X.	DISCUSIÓN	68
XI.	CONCLUSIÓN	74
XII.	REFERENCIAS	75

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS		
		Página
TABLA I	Clasificación Histológica Internacional de lo OMS, de los tumores de Pulmón	7
TABLA II	Clasificación clínica TNM del cáncer de pulmón	10
TABLA III	Agrupamiento del cáncer de pulmón por estadios	11
TABLA IV	Tratamiento general contra el cáncer de pulmón de acuerdo a su estadio	15
TABLA V	Principales fármacos utilizados en quimioterapia contra el cáncer de pulmón	16
TABLA VI	Transportadores ABC humanos Transportadores ABC humanos (continuación)	22 23
TABLA VII	Substratos de glicoproteína-P	29
TABLA VIII	Moduladores de la actividad de glicoproteína-P	31
TABLA IX	Principales características de las topoisomerasas humanas	39
TABLA X	Comparación de los valores de IC ₅₀ entre dos líneas celulares de cáncer de pulmón crecidas como monocapa (2D) o microesférulas (3D)	44
TABLA XI	Oligonucleótidos de amplificación para experimentos de RT-PCR.	53

FIGURAS		
		Página
Figura 1	Estimado de muertes anuales causadas por el cáncer.	4
Figura 2	Mecanismos celulares relacionados con la resistencia a múltiples fármacos.	18
Figura 3	Diagrama característico de un transportador ABC	20
Figura 4	Estructura de los transportadores ABC relacionados con la resistencia a fármacos.	21
Figura 5	Mecanismos de acción de glicoproteína-P, propuesto para la expulsión de fármacos.	24
Figura 6	Representación esquemática de la glicoproteína-P.	26
Figura 7	Factores de transcripción que regulan el promotor de MDR1	27
Figura 8	Microscopía electrónica de las células tumorales de pulmón cultivadas como microesférulas.	42
Figura 9	Expresión del transcrito de los genes relacionados con la resistencia a fármacos en las líneas celulares INER-37 e INER-51.	45
Figura 10	Caracterización de la línea INER-51 en cultivos de microesférulas.	56
Figura 11	Ensayo de retención de DXR en cultivos de INER-51	57
Figura 12	Ensayo de expulsión de DXR en las células INER-51.	58
Figura 13	Efecto de agentes inhibidores de la actividad de glicoproteína-P en cultivos de monocapa y microesférulas de INER-51.	60
Figura 14	Retención de rhodamina 123 en cultivos de monocapa y microesférulas de INER-51.	61

Figura 15	Actividad de glicoproteína-P en ausencia de ATP.	62
Figura 16	Expresión del transcrito de BCRP (<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>) en la línea celular INER-51.	63
Figura 17	Expresión del transcrito de MDR-1 en las líneas celulares INER-51 y la clona I-51/PSC.	64
Figura 18	Expresión de los transcritos de genes relacionados con la resistencia a fármacos en INER-51 y su clona I-51/PSC.	65
Figura 19	Efecto de la citotoxicidad de doxorrubicina, etopósido y metotrexato en la línea celular INER-51 y la clona I-51/PSC.	66
Figura 20	Retención de fármacos (DXR y Rho123) en cultivos de monocapa y microesférulas de I-51/PSC.	67

I. ABREVIATURAS

5-FU	5 Fluorouracilo
Ara C	Arabinócido de citosina
BCRP	Proteína de cáncer de mama relacionada con la resistencia. (<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>)
CPT	Camptotecina
Cs-A	Ciclosporina-A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
gp-P	Glicoproteína-P
I-51	Línea celular INER-51
I-51/PSC	Clona seleccionada de INER-51 con fenotipo gp-P ^{neg}
IC ₅₀	Índice de citotoxicidad media
LRP	Proteína de cáncer de pulmón asociada con la resistencia. (<i>Lung Resistance Protein</i>)
MDR	Resistencia a múltiples fármacos (<i>Multidrug Resistance</i>)
MDR-1	Gen que codifica para la glicoproteína-P
MRP-1	Proteína relacionada con la resistencia a fármacos. (<i>Multidrug Resistance associated Protein</i>)
MTX	Metotrexato
NSCLC	Carcinoma de células no pequeñas (<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
PSC833	Valspodar o ciclosporina F
Rho	Rhodamina 123
RNA	Ácido ribonucleico
SCLC	Carcinoma de células pequeñas (<i>Small Cell Lung Cancer</i>)
Topo II	DNA topoisomerasa tipo II
VP-16	Etopósido
VRP	Verapamil

II. RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, presentando la mayor incidencia el cáncer de pulmón. Uno de los principales problemas que se presentan en el tratamiento de los tumores es una mala respuesta al régimen de quimioterapia, fenómeno descrito como resistencia a múltiples fármacos. La adquisición de la resistencia a múltiples fármacos está asociada con la expresión de glicoproteína-P (gp-P), la cual funciona como una bomba que se encarga de expulsar los fármacos del interior de la célula, mediante la hidrólisis de ATP. Con la finalidad de estudiar este fenómeno en tumores sólidos, se han desarrollado cultivos de células tumorales en agregados multicelulares conocidos como microesférulas. Con este modelo se ha observado que las células tumorales adquieren una mayor resistencia a fármacos, que la observada en células crecidas en monocapa. Para conocer cuál es el papel de gp-P en la adquisición de la resistencia en cultivos de microesférulas, se estudió la respuesta a varios agentes antitumorales, en una línea celular de cáncer de pulmón (INER-51). Al realizar ensayos de retención de fármaco se observó que las microesférulas retenían menos fármaco que las células en monocapa. El análisis funcional de la gp-P mostró que no había efecto del inhibidor ciclosporina-A sobre la actividad de gp-P ya que no se incrementó la concentración interna del fármaco en las microesférulas. Al obtener una clona con fenotipo gp-P^{neg} (I-51/PSC) por selección negativa, tampoco se obtuvo un incremento en la retención de fármaco en cultivos de microesférula, pero preservó su fenotipo de resistencia a fármacos utilizados en quimioterapia. Con estos datos se puede concluir que gp-P no es la responsable de la resistencia a múltiples fármacos en las microesférulas de INER-51 y que dicha resistencia está dada por otros mecanismos de resistencia.

II.1 ABSTRACT

Expression of P-glycoprotein (P-gp), the multidrug resistance 1 gene (MDR1) product, can lead to multidrug resistance in tumours. However, the physiological role of P-gp in tumours growing as multicellular spheroids is not well understood. Recent evidence suggests that P-gp activity may be modulated by cellular components such as membrane proteins, membraneanchoring proteins or membrane-lipid composition. Since, multicellular spheroids studies have evidenced alterations in numerous cellular components, including those related to the plasma membrane function, result plausible that some of these changes might modulates P-gp function and be responsible for the acquisition of multicellular drug resistance. In the present study, we asked if a human lung cancer cell line (INER-51) grown as multicellular spheroids can modify the P-gp activity to decrease the levels of doxorubicin (DXR) retained and increase their drug resistance. Our results showed that INER-51 spheroids retain 3-folds lower DXR than the same cells as monolayers however, differences in retention were not observed when the P-gp substrate Rho123 was used. Interestingly, neither the use of the P-gp-modulating agent cyclosporin-A (Cs-A) nor a decrease in ATP-pools were able to increase DXR retention in the multicellular spheroids. Only the lack of P-gp expression throughout the pharmacological selection of a P-gp negative (P-gp^{neg}) mutant clone (I-51/PSC) derived from INER-51 cells, allow increase of DXR retention in spheroids. Thus, multicellular arrangement appears to alter the P-gp activity to maintain lower levels of DXR. However, the non expression of P-gp by cells forming multicellular spheroids has only a minor impact in the resistance to chemotherapeutic agents.

III. INTRODUCCIÓN

III.1. IMPORTANCIA DEL CÁNCER COMO ENFERMEDAD MUNDIAL.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (2ª causa después de las enfermedades cardiovasculares). El cáncer es un grupo de enfermedades que tiene múltiples variables, donde se ven relacionadas la edad del paciente al momento del diagnóstico de la enfermedad, grado de crecimiento del tumor, estadio de diferenciación celular, el potencial del tumor de invadir y producir metástasis; respuesta del tumor al tratamiento y el pronóstico de la enfermedad.¹

El crecimiento celular normal está finamente controlado por un balance entre la promoción y la inhibición de la proliferación celular; cuando las condiciones celulares y su relación con el medio son óptimas, las células activan una cascada de señalización para impulsar los mecanismos necesarios para la proliferación celular. Generalmente, después de la proliferación celular las células pasan una serie de cambios en su patrón de expresión genética que dan como resultado la diferenciación celular, proceso por el cual la célula se especializa en diferentes actividades propias del tejido. En las células tumorales se presenta una pérdida en el control del crecimiento, continuando con la proliferación celular (sin restricciones aparentes) y presentándose pérdida de su fenotipo diferenciado, dando origen a una población celular con características y necesidades diferentes a las propias de las células del tejido. A lo largo de los años se ha obtenido importante información sobre la regulación del crecimiento celular y la proliferación permitiendo identificar la presencia de proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Los proto-oncogenes codifican para proteínas que son importantes en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, control del ciclo celular y apoptosis. Mutaciones en estos genes actúan dominantemente y llevan a una ganancia de funciones. En contraste los genes supresores de tumores inhiben la

proliferación celular, al detener la progresión del ciclo celular, cambios en las moléculas de adhesión o invasión; o bloquean la diferenciación.¹

Las células tumorales presentan una serie de características que las diferencia de las células normales: **a)** las células tumorales no dependen de los factores de crecimiento externos como las células normales ya que son capaces de secretar sus propios factores de crecimiento para estimular su propia proliferación, proceso conocido como estimulación autócrina; **b)** las células normales responden a la presencia de otras células, y en cultivo pueden formar una monocapa dada por inhibición de contacto, **c)** las células normales se detienen al llegar a una cierta densidad celular, sin embargo, las células tumorales carecen de esta inhibición y menudo continúan proliferando; **d)** las células tumorales son menos adhesivas, ya que presentan un recambio de membrana más acelerado y un citoesqueleto más activo que las normales, lo cual contribuye a su capacidad de invadir y producir metástasis en otros tejidos.^{1,2.}

III.2 CÁNCER DE PULMÓN

En el año 2007 se estimaba que habían más de 12 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial y un aproximado de 6.7 millones de muertes a causa de ésta enfermedad. Los tipos de cáncer que presentan una mayor incidencia a nivel mundial son los de: pulmón (12.8%), mama (10.4%), estómago (8.7%), colon/recto (8.7%) e hígado (5.4%). Los de mayor mortalidad a nivel mundial son los de pulmón (17.8%), estómago (10.4%), hígado (8.8%) y colon/recto (8.4%). En términos de prevalencia, los más comunes son: mama (6.1%), cáncer colorectal (10.6%) y próstata (6.9%).^{3,4} (*Figura 1*)

En la actualidad, el cáncer pulmonar es la neoplasia más común a nivel mundial (12.8% de todos los tipos tumorales). El 52% de los casos de cáncer de pulmón se presentó en los países industrializados, y está relacionado con el alto consumo de tabaco y con la

exposición de factores contaminantes del ambiente. En el año 2001, el “*Cancer Progres Report*” presentado por los “*National Institutes of Health*” se estimó que podrían haber 169, 500 casos nuevos y 157, 400 muertes por cáncer de pulmón.^{4,5.}

El cáncer de pulmón es más común en hombres pero su incidencia va aumentando en el caso de las mujeres. La relación varones/mujeres que murieron a causa del cáncer de pulmón durante los últimos 25 años cambió de manera constante, desde 8:1 hasta aproximadamente 3:1, debido al aumento en el consumo de tabaco por las mujeres.^{6-8.}
(Figura 1)

En México, estudios realizados por Lazcano y col.⁹, describen un crecimiento importante en la mortalidad observada por cáncer de pulmón entre 1979 y 1993. A través de dicho análisis se predijo que para el año 2010 se presentarán más de 10,000 muertes por esta causa. En hospitales especializados como el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el número de casos atendidos por esta patología va en aumento, observándose además un cambio en el tipo histopatológico predominante, que en la actualidad es el adenocarcinoma.^{10,11.} En el año 2006 de acuerdo con las cifras reportadas por el INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática), se registraron 494 471 defunciones, dentro de las principales causas de muerte se encuentra el cáncer de pulmón ocupando el 1.4% de las muertes totales. Esto corresponde a una tasa de 6.2 por cada 100 000 habitantes (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática/ Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. Base de datos de defunciones 2006.)¹², siendo el cáncer de pulmón el principal tipo tumoral responsable de la mortalidad de nuestro país. Las zonas de mayor incidencia y mortalidad corresponden a la zona Norte y Centro del país, lo cual se relaciona con el grado de industrialización y hábito de tabaquismo.¹²⁻¹⁴

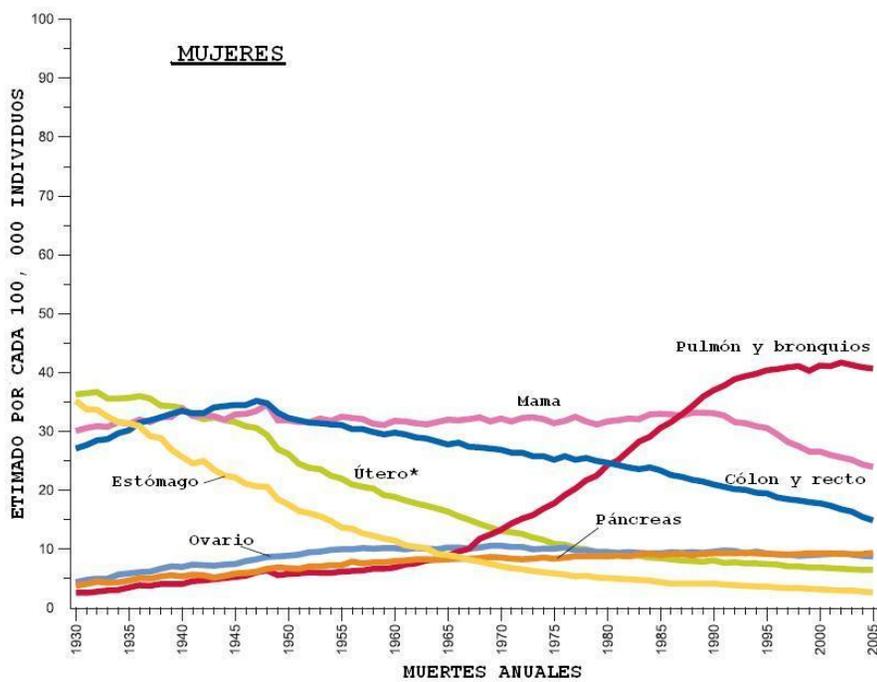
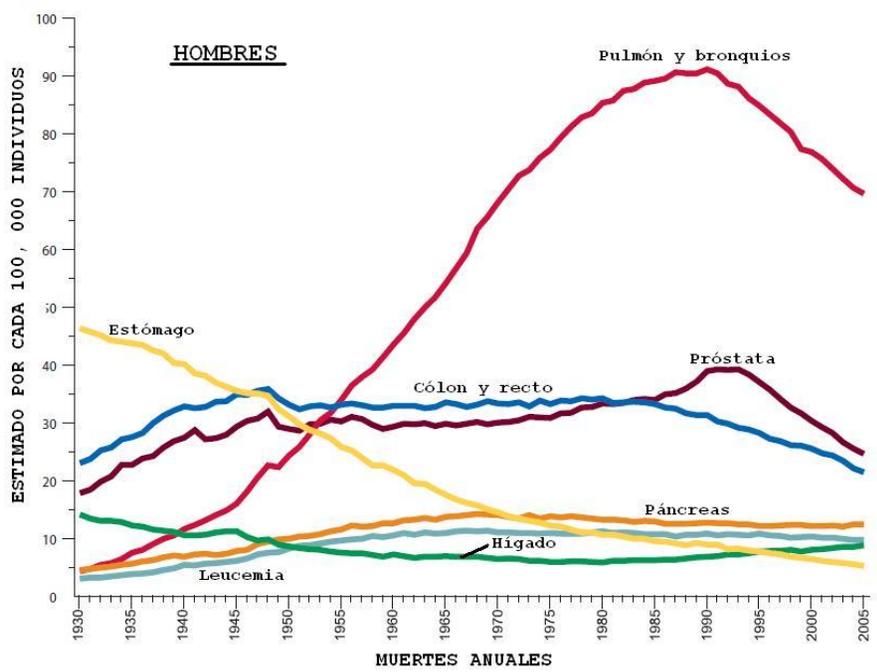


Figura 1. Estimado de muertes anuales causadas por cáncer. A) Hombres y B) Mujeres para una selección de tipos de cáncer en Estados Unidos, durante el periodo de 1930 al 2005.⁷
 *Útero incluye tanto el cáncer cervicouterino y cuerpo uterino.

III.2.1 Etiología del cáncer de pulmón.

En la etiología del cáncer pulmonar, el tabaco es uno de los principales agentes causales.

En la etiología del cáncer pulmonar, el tabaco es uno de los principales agentes causales. En países con una larga historia de fumadores, >90% de los casos en hombres están relacionados con el tabaco.¹⁵ Los pacientes que presentan un historial de fumadores incrementan el riesgo de padecer cáncer de pulmón de 11 a 22 veces en comparación con los no fumadores. Los llamados “fumadores pasivos” (personas que se encuentran en un ambiente de humo de tabaco) también incrementan el riesgo de presentar cáncer de pulmón. De acuerdo con los datos presentados por el “*National Institute of Health*”, cada año cerca de 3 000 personas no fumadoras mueren de cáncer de pulmón como resultado de respirar el humo de otros fumadores.^{16,17}

El de cáncer de pulmón también progresa por la exposición a agentes carcinogénicos presentes en el medio ambiente, principalmente en áreas urbanas muy contaminadas; y los relacionados con la actividad laboral. Estos agentes incluyen arsénico, asbestos, bencenos, hidrocarburos, cromo, níquel y radón.¹⁸

Individuos con historia familiar de cáncer de pulmón incrementan el riesgo para desarrollar cáncer de pulmón, (principalmente del tipo carcinoma de pulmón de células no pequeñas, NSCLC). Los fumadores con antecedentes familiares de cáncer de pulmón tiene un riesgo relativo de 2 a 2.5 veces mayor en relación con los fumadores sin antecedentes familiares. La explicación de esto está relacionada con los mecanismos que definen la susceptibilidad al humo del tabaco (metabolismo de control de los carcinógenos)¹⁸

III.2.2 Cambios genéticos del cáncer de pulmón

Gracias a los avances en las técnicas de citogenética y de la biología molecular se han podido identificar algunas de las alteraciones genéticas que se presentan en los tumores humanos de pulmón. Estudios de citogenética en tumores histológicamente relacionados han mostrado una frecuencia elevada de deleciones, lo cual sugiere que la pérdida de la función de supresión tumoral puede ser un paso crítico en las primeras etapas de desarrollo del tumor del pulmón. La frecuente pérdida de la heterocigocidad de los cromosomas 9p, 13q y el 17p abarcan los genes supresores de tumores, p16^{INK4}, retinoblastoma (Rb) y p53, respectivamente.¹⁹⁻²⁰ También se puede presentar una sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular: bombesina, EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico por sus siglas en inglés), ciclina D1 y genes relacionados con la protección de la muerte celular por apoptosis como: bcl-2.¹⁹⁻²⁰ Otras alteraciones moleculares que se han observado son las inestabilidades microsatelitales, metilación aberrante del DNA que causa la inactivación o activación de genes relacionados con la progresión del ciclo celular o con el metabolismo celular. Dentro de los eventos moleculares presentes, se observa la activación de oncogenes (ejem. c-myc y c-ras), y la inactivación de genes supresores de tumores (p53, Rb y p16).^{2,19-24.}

III.2.3. Clasificación del cáncer de pulmón.

Los tumores malignos primarios de pulmón se clasifican según sus características histopatológicas. La identificación histológica es importante porque a partir de ella se planea el tratamiento terapéutico.

La clasificación histológica del cáncer de pulmón propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS o “*World Health Organization*”, WHO) ha tenido gran aceptación, aunque hay algunas variaciones en cuanto a la definición precisa de cada grupo. (Tabla I)^{26,27}

Tabla I. Clasificación Histológica Internacional de la OMS, de los Tumores de Pulmón^{27,28}

I.- Carcinomas epidermoides

- 1.-Epidermoide bien diferenciado
- 2.-Epidermoide moderadamente diferenciado
- 3.-Epidermoide pobremente diferenciado

II.- Carcinomas de células pequeñas

III.- Adenocarcinomas

- 1.-Carcinomas acinares bien diferenciados
- 2.-Carcinomas bronquioloalveolares
- 3.-Adenocarcinomas pobremente diferenciados

IV.-Carcinomas de células grandes

V.-Carcinomas con dos tipos de variedades adenocarcinoma y epidermoide

VI.-Tumores carcinoides

VII.-Tumores de glándulas bronquiales

- 1.-Cilindromas
- 2.-Tumores mucoepidermoides
- 3.-Otros

VIII.- Tumores papilares del epitelio superficial

IX.- Tumores "mixtos" y carcinosarcomas

X.-Sarcomas

XI.-Sin clasificar

XII.- Mesoteliomas

XIII.-Melanomas

El tipo de cáncer de pulmón es un factor principal para determinar la sobrevivencia. Los carcinomas no diferenciados, particularmente los de "células en avena", tienen un pronóstico pobre, dado que crecen rápidamente y tienen un alto potencial metastásico. Por contraste con los carcinomas escamosos, que crecen rápidamente pero muestran una baja tendencia a metastatizar, los adenocarcinomas crecen lentamente, pero tienen un alto potencial metastásico.²⁶

En la práctica clínica, los tumores primarios de pulmón generalmente se clasifican en dos grupos principales: carcinoma de pulmón de células no-pequeñas (*non-small cell lung cancer*, **NSCLC**) y carcinoma de células pequeñas (*small cell lung cancer*, **SCLC**). Este tipo de clasificación refleja fundamentalmente diferencias en la estructura y fisiología de las células tumorales, y sirve como guía para elegir la estrategia de tratamiento²⁷⁻²⁹

- a) Carcinoma de células pequeñas (*Small cell lung cancer*; SCLC). Representan el 15-35% del cáncer de pulmón. Tienen una distribución central y metastatizan de forma precoz a médula ósea, hipófisis, tiroides, testículos y paratiroides.

- b) Carcinoma de células no-pequeñas (*Non-Small cell lung cancer*; NSCLC)
 - 1) Carcinoma epidermoide. Constituyen del 15 al 35% del cáncer de pulmón. Tienen una distribución central e invaden el cartílago bronquial, causando obstrucción. Tumores diferenciados con abundante queratina y producen metástasis en etapas relativamente tardías.
 - 2) Adenocarcinoma. Del 35 al 50% de los tumores de pulmón son adenocarcinomas. La mayoría de ellos se localizan en la periferia y tienden a invadir la pleura. Los adenocarcinomas son capaces de secretar mucopolisacáridos por lo cual, las células contienen múltiples vacuolas.
 - 3) Carcinoma de células grandes. Estos tumores representan alrededor del 5-20%. Elementos epidermoides y adenocarcinomas, escasamente diferenciados. Tienen localización central y periférica

A lo largo de este documento se utilizará la clasificación de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), debido a su importancia clínica y sus esquemas de tratamiento, especialmente en quimioterapia.

III.2.4. Diagnóstico

El cáncer de pulmón en etapas tempranas de su desarrollo es asintomático, pero dependiendo del grado de avance del tumor y de su localización se pueden presentar diversos signos y síntomas. La principal característica se basa en la presencia de tos y hemoptisis. El cáncer de pulmón se presenta más comúnmente en el lóbulo superior del pulmón derecho. Por lo general, la localización del tumor se divide en central y periférica, esta localización está relacionada con los diferentes tipos histológicos, lo cual se discutirá más adelante.²⁸⁻³¹

Cuando el tumor es más extenso y llega a formar metástasis se presenta disfonía, disnea, disfagia y signos de taponamiento pericárdico. Sus signos y síntomas sistémicos consisten en malestar en general, debilidad, anorexia, pérdida de peso, dolor o masa abdominal, dolor óseo o fractura, ictericia, convulsiones, déficit neurológico y alteraciones del estado mental.

La detección del cáncer de pulmón suele ser un hallazgo radiológico inesperado o determinado por algunos síntomas que sugieran un problema respiratorio, siendo el más frecuente la tos que no cede ante el tratamiento médico. Las formas avanzadas dependen de las alteraciones derivadas de la actividad metastásica del tumor. Los métodos diagnósticos son la obtención de imágenes por medio de uno o más métodos (radiografía, PET o CT), la toma de muestras para biopsias y de ahí progresivamente a la estadificación del tumor, la selección de tratamiento(s) y el pronóstico.^{31,32}

Además de evaluar los síntomas de presentación y realizar un examen físico completo, todos los pacientes que puedan tener cáncer de pulmón, deben ser evaluados mediante radiografía de tórax, tomografía computarizada, resonancia magnética y exploración por PET (*Positron Emission Tomographic Scanning*). También se pueden realizar procesos invasivos como broncoscopia, aspiración transbronquial y biopsia transtorácica.³¹

III.2.5. Estadio del cáncer de pulmón

Para la clasificación de los tumores se consideran factores como el tamaño, localización y extensión de la invasión local, esto está dado mediante el sistema de estadificación “TNM”, donde el factor T (extensión del Tumor primario); el factor N (metástasis en los ganglios linfáticos regionales) que relaciona los ganglios linfáticos regionales y el factor M (Metástasis a distancia) que señala la importancia de las metástasis a distintos órganos, lóbulos pulmonares, pared torácica, etc.²⁸(Tabla II) Al conjuntar las características anatómicas y morfológicas obtenidas por el TNM, se pueden agrupar a los pacientes en diferentes estadios TNM (Tabla III)²⁸. La estadificación se realiza con la finalidad de determinar la extensión de la enfermedad para agrupar a los pacientes con niveles similares de la enfermedad para propósitos analíticos, terapéuticos y de pronóstico. El estadio del cáncer de pulmón es esencial para definir si el tumor es operable, para seleccionar el régimen de tratamiento, para predecir la sobrevivencia y para reportar y comparar resultados.

Tx	Citología positiva
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	≤ 3cm
T2	> 3cm/extendido a región hilar/invaide pleura visceral/atelectasia parcial
T3	Pared torácica, diafragma, pericardio, pleura mediastinal, etc., atelectasia total.
T4	Mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, etc., derrame maligno
N1	Peribronquial, hilar homolateral
N2	Mediastino homolateral
N3	Mediastinal contralateral escaleno o supraclavicular
Mx	La presencia de metástasis a distancia no puede ser evaluada
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Con metástasis a distancia

Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadio II	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Estadio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N0,N1,N2	M0
Estadio IIIB	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

III.3. TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER DE PULMÓN

III.3.1 Generalidades

La respuesta de los tumores hacia el tratamiento de quimioterapia puede ser variable dependiendo de las condiciones fisiológicas del paciente, grado de avance (estadio) y tipo histológico del tumor.

Se puede decir que existen tres formas de respuesta de los pacientes con tumores hacia el tratamiento de quimioterapia: ^{26,31,32}

1. Tumores que responden favorablemente al tratamiento con quimioterapia donde se observa una pronta reducción en el número de células tumorales (i.e. leucemias) o disminución de la masa tumoral. Algunos ejemplos son: la leucemia linfoblástica aguda en niños (ALL), enfermedad de Hodgkin, algunos linfomas no-Hodgkin y el cáncer de testículo.
2. Tumores que en las primeras exposiciones de quimioterapia responden favorablemente al tratamiento y posteriormente se vuelven refractarios a las siguientes dosis o terapias de tratamiento. Este es el caso de carcinoma de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), y cáncer de ovario. La falta de respuesta puede incluir fármacos que no se utilizaron durante el 1er tratamiento. Este fenotipo está determinado por la presencia de mecanismos de resistencia a

fármacos, que pueden interferir con la acción de otros fármacos utilizados en quimioterapia.

3. Tumores resistentes al tratamiento desde un principio, tales como: el cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC), melanoma maligno, y cáncer de colon.

Carcinoma de Pulmón de Células Pequeñas (*SCLC*)

El carcinoma de pulmón de células pequeñas tiene la capacidad de producir metástasis tempranas (en comparación con el carcinoma de células no-pequeñas) y pocas veces se encuentra de forma localizada. El SCLC tiene el curso clínico más agresivo, con una supervivencia media después del diagnóstico, de 2-4 meses sin tratamiento. Los pacientes con SCLC confinado en el tórax son denominados como “estadio limitado” (cuando la enfermedad se encuentra localizada en un hemitorax, incluyendo el mediastino, el hilio y ganglios linfáticos supraclavicular.), reciben un tratamiento a base de radioterapia seguido de un tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino y etopósido. Los pacientes que presentan un “estadio extensivo” (la enfermedad se extiende más allá del tórax), reciben únicamente tratamiento de quimioterapia combinada (cisplatino, etopósido, irinotecan, topotecan o paclitaxel.) (*Tabla IV*)^{30,33,34}.

Carcinoma de Pulmón de Células No-Pequeñas (*NSCLC*)

Los mejores factores pronóstico para el NSCLC son el estadio y el nivel de respuesta. La determinación del estadio es crítica para la selección de terapia. La cirugía es considerada como el principal tratamiento para el NSCLC. Solo el 25-30% de los pacientes con NSCLC presentan el tumor confinado en el pulmón (estadio I-II), para los cuales la cirugía presenta buena perspectiva. Sin embargo, a pesar de una completa resección del tumor y una terapia combinada con fármacos, la expectativa de vida a 5 años presenta resultados desalentadores, con un 65% para pacientes con enfermedad en etapa T1N0 y 23% para pacientes en T1-3N0.

Como terapia postoperatoria se puede utilizar la radioterapia, aunque algunos estudios sugieren que tiene efectos perjudiciales para el paciente, previniendo la recurrencia local pero no aumentando la supervivencia. También se puede utilizar la quimioterapia para eliminar micrometástasis no detectadas y aumentando los niveles de supervivencia.

Con los nuevos regímenes de tratamiento se ha utilizado también, la radioterapia y quimioterapia como una terapia pre-operatoria. Esta terapia disminuye la masa tumoral, y permite que posteriormente se realice la cirugía de resección del tumor.

Los tumores no operables por ser estadio III o por invadir estructuras vitales eran tratados con radioterapia, pero en la actualidad se ha observado que la quimioterapia combinada proporciona mejores resultados. Anteriormente, los pacientes con enfermedad avanzada en estadios IIIB y IV no eran tratados, y las ocasiones en que eran tratados con quimioterapia tenían una baja respuesta al tratamiento y el tiempo de supervivencia era poco. En la actualidad el utilizar una quimioterapia combinada ha mejorado la calidad de vida de los pacientes, disminuyendo los síntomas de la enfermedad y aumentando en un 2.5 meses la supervivencia. (*Tabla IV*)^{31,33,35}

III.3.2 *Quimioterapia*

Hasta la fecha, una gran variedad de fármacos se utilizan en el tratamiento del cáncer de pulmón tanto de células pequeñas (SCLC) como de células no-pequeñas (NSCLC) (*Tabla V*)³¹ Una serie de estudios de meta-análisis a lo largo de 25 años han demostrado que la terapia simple (un solo fármaco), no proporciona ningún avance en el tratamiento del paciente con cáncer de pulmón. La quimioterapia para estadios avanzados de cáncer de pulmón es considerada como ineficiente o con grandes niveles de toxicidad.

Al realizar una terapia combinada se toman en cuenta los siguientes criterios, se utilizan fármacos con diferentes mecanismos de acción (agentes intercalantes, antibióticos, inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, inhibidores de microtúbulos) (*Tabla V*), con diferente perfil de toxicidad y se utiliza la máxima dosis efectiva del fármaco.

Las combinaciones de tratamiento que han mostrado una mayor eficiencia para el SCLC son: etopósido-cisplatino; etopósido-carboplatin; irinotecan-cisplatino; ciclofosfamida-doxorrubicina y vincristina o ifosfamida.

Para el tratamiento de NSCLC las combinaciones de quimioterapia que han presentado mejores resultados son: la combinación de un fármaco compuesto de platino y otro fármaco como vinca alcaloides, etopósido, etc. El desarrollo de nuevos fármacos como gefitinib y erlotinib han favorecido la respuesta del los NSCLC al tratamiento, en un 5-15%^{31,33,35,36}

Este tipo de tratamiento ha dado a los pacientes una mejor calidad de vida y un incremento en la supervivencia, sin embargo, hay que tener en cuenta la respuesta de cada paciente para una mejor calidad de vida, una menor toxicidad y un aumento en la supervivencia.^{31-36.}

III.4 RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS (*Multidrug Resistance*, MDR)

El fracaso de la respuesta del cáncer a una terapia específica puede ser resultado de diversas causas generales: factores del paciente y alteraciones genéticas específicas de las células tumorales. Los factores del paciente incluyen; **a)** una pobre absorción, un rápido metabolismo o excreción del fármaco, dando como resultado una pobre concentración del fármaco en el torrente sanguíneo; **b)** pobre tolerancia a los efectos del fármaco, específicamente en pacientes de edad avanzada, resultando en una necesidad de reducir las dosis por debajo de los niveles óptimos; **c)** inhabilidad de difundir el fármaco y una baja penetración del fármaco en los tejidos; **d)** y condiciones en el ambiente tumoral del paciente, las cuales pueden afectar la respuesta del tumor incluyendo un metabolismo local del fármaco por las células no-tumorales, características inusuales del suplemento de sangre en el tumor la cual puede afectar el tiempo de transito del fármaco en los tumores y la forma en que interactúa con las células del cáncer y con las células intersticiales del paciente.³⁷⁻³⁹

Tabla IV. TRATAMIENTO GENERAL CONTRA EL CÁNCER DE PULMÓN DE ACUERDO A SU ESTADIO			
Estadio	Tratamiento Primario	Terapia Adyuvante	Resultados
Carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC)			
Estadio limitado	Quimioterapia y radioterapia	No descrita	Sobrevivencia a 5 años del 15-25%
Estadio extensivo	Quimioterapia	No descrita	Sobrevivencia a 5 años < 5%
Carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)			
I	Cirugía	Quimioterapia	Sobrevivencia a 5 años >60-70%
II	Cirugía	Quimioterapia con/sin radiación	Sobrevivencia a 5 años >40-50%
IIIA (Operable)	Quimioterapia pre-operatoria seguida de resección quirúrgica, o resección quirúrgica	Radioterapia con quimioterapia (sin tratamiento previo) o sin quimioterapia	Sobrevivencia a 5 años del 15-30%
IIIA (no operable) o IIB	Quimioterapia con radioterapia o quimioterapia seguida de radioterapia	No descrita	Sobrevivencia a 5 años del 10-20%
IIIB con derrame pleural o IV	Terapia combinada de 3 a 4 ciclos	No descrita	Sobrevivencia media de 8-10 meses
	Cirugía de resección de metástasis solitaria a cerebro y cirugía de resección a la lesión primaria (T1)		Sobrevivencia a 1 año del 30-35%. Sobrevivencia a 2 años del 10-15%. Sobrevivencia a 5 años del 10-15%
Estos regímenes de tratamiento están basados en los datos obtenidos por la asociación "International adjuvant lung cancer trial", los cuales han demostrado pequeños pero significativos avances al utilizar tratamientos basados en cisplatino. ⁽³¹⁾			

Tabla V. PRINCIPALES FÁRMACOS UTILIZADOS EN QUIMIOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DE PULMÓN

FÁRMACO	MECANISMO	ACTIVIDAD	MECANISMO DE RESISTENCIA
Derivados del Platino			
Cisplatino	Alquilante del DNA. Forma aductos de guanina o adenina	Interfiere con la síntesis de DNA y RNA	Aumento en la actividad de los mecanismos de reparación del DNA. Incremento en las concentraciones de GSH. Inducción de metalotioneínas.
Carboplatin	Alquilante del DNA. Forma aductos de guanina o adenina	Interfiere con la síntesis de DNA y RNA	Aumento en la actividad de los mecanismos de reparación del DNA. Incremento en las concentraciones de GSH. Inducción de metalotioneínas.
Etopósido (VP-16)	Inhibidor de Topoisomerasas II	Induce cortes de doble cadena del DNA al estabilizar el complejo Topoisomerasa II-DNA, provocando la fragmentación del DNA.	Aumento en la expresión de glicoproteína-P. Baja entrada del fármaco. Aumento en la actividad de mecanismos de reparación del DNA. Mutaciones en la proteína topoisomerasa II. (modificación de su actividad, expresión, localización, etc.)
Tenipósido	Inhibidor de Topoisomerasas II	Induce cortes de doble cadena del DNA al estabilizar el complejo Topoisomerasa II-DNA, provocando la fragmentación del DNA.	Aumento en la expresión de glicoproteína-P. Baja entrada del fármaco. Aumento en la actividad de mecanismos de reparación del DNA. Mutaciones en la proteína topoisomerasa II. (modificación de su actividad, expresión, localización, etc.)
Camptotecina, Topotecan, CPT	Inhibidor de topoisomerasas I	Induce rompimientos de una sola cadena de DNA al interferir con la actividad de Topoisomerasa I	Baja concentración de Topoisomerasa I, mutaciones en la proteína blanco. Elevada expresión de glicoproteína-P, MRP2. Aumento en la actividad de los mecanismos de reparación del DNA
Irinotecan, CPT-11	Inhibidor de topoisomerasas I	Induce rompimientos de una sola cadena de DNA al interferir con la actividad de Topoisomerasa I	Baja concentración de Topoisomerasa I, mutaciones en la proteína blanco. Elevada expresión de glicoproteína-P, MRP2. Aumento en la actividad de los mecanismos de reparación del DNA
Gemcitabina	Antimetabolito	Inhibe la actividad de la ribonucleótido reductasa. Inhibe la síntesis de nucleótidos y de ácidos nucleicos.	Deficiencia en la actividad de cinasa de deoxicitidina. Sobreexpresión de la deaminasa de citidina.
Paclitaxel	Inhibidor de microtúbulos.	Se une a la tubulina y promueve la estabilización y polimerización de los microtúbulos, ocasionando la muerte celular. Bloquea las fases G2/M del ciclo celular	Expresión de glicoproteína-P. Mutaciones en las subunidades de tubulina.
Vincristina y Vinblastina	inhibidores de microtúbulos	Se une a los dímeros libres de tubulina bloqueando su polimerización. Detiene las células en metafase.	Aumento en la expresión de glicoproteína-P. Mutaciones en la tubulina.
Vinorelbina	inhibidores de microtúbulos	Se une a los dímeros libres de tubulina bloqueando su polimerización. Detiene las células en metafase.	Aumento en la expresión de glicoproteína-P. Mutaciones en la tubulina.
Doxorrubicina	Intercalante	Intercalación en el DNA bloqueando la síntesis de DNA y RNA, interfiere con la actividad de Topoisomerasa II causando rompimientos en la cadena de DNA	Expresión de glicoproteína-P. Cambios en la actividad de topoisomerasa II, incremento en la actividad de la peroxidasa de glutatión.
Ciclofosfamida	Forma aductos de guanina en el DNA.	Interfiere con la síntesis de DNA y RNA. Inhibe la proliferación celular	Aumento en la actividad de mecanismos de reparación del DNA. Disminución de la permeabilidad al fármaco. Reacción del fármaco con glutatión.
Gefitinib y Erlotinib	Inhibidor de EGFR (EGFR-TKI)	Bloquea la señalización de EGFR	Aumento en la expresión de EGFR y HER2. Mutaciones en EGFR y HER2

Las células no neoplásicas de un mismo tipo histológico presentan una respuesta similar al exponerse a fármacos antineoplásicos. Sin embargo, las células tumorales pueden presentar una respuesta que no es predecible. Las células tumorales obtenidas de los pacientes presentan cambios en la expresión génica, variaciones en la organización genética y en ocasiones la creación de genes híbridos; dependiendo no solo del tejido donde se originó sino también de los patrones de activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores. Cada tipo de cáncer expresa diferentes combinaciones de genes, lo cual da como resultado que en un tumor exista una gran heterogeneidad celular. Dicha combinación de genes puede estar relacionada con el fenotipo de resistencia a fármacos. Gracias a estas características, aún si el tumor no presenta una resistencia a fármacos de manera intrínseca, esta heterogeneidad genética y epigenética bajo condiciones de tratamiento con fármacos puede dar como resultado el crecimiento de variantes con resistencia y una rápida adquisición del fenotipo de resistencia a fármacos en muchos tipos de cáncer.^{38,39}

La resistencia a múltiples fármacos consiste en la resistencia simultánea de las células tumorales a múltiples fármacos citotóxicos, el cual es un fenómeno complejo. La resistencia a múltiples fármacos puede ocurrir por: cambios que impiden la acumulación de fármaco al limitar su entrada; incremento en su expulsión; o afectar los lípidos de membrana como las ceramidas. Estos cambios pueden: **1)** bloquear la muerte celular programada (apoptosis) que es activada por los fármacos antitumorales, **2)** activar mecanismos generales de respuesta para desintoxicación de fármacos y reparar del daño al DNA, y **3)** alterar el ciclo celular y puntos de control que pueden hacer a las células relativamente resistentes a los efectos citotóxicos de los fármacos en las células tumorales (*Figura 2*). La resistencia a múltiples fármacos da como resultado el mayor obstáculo y limitación para el éxito del tratamiento del cáncer con quimioterapia.³⁷⁻⁴²

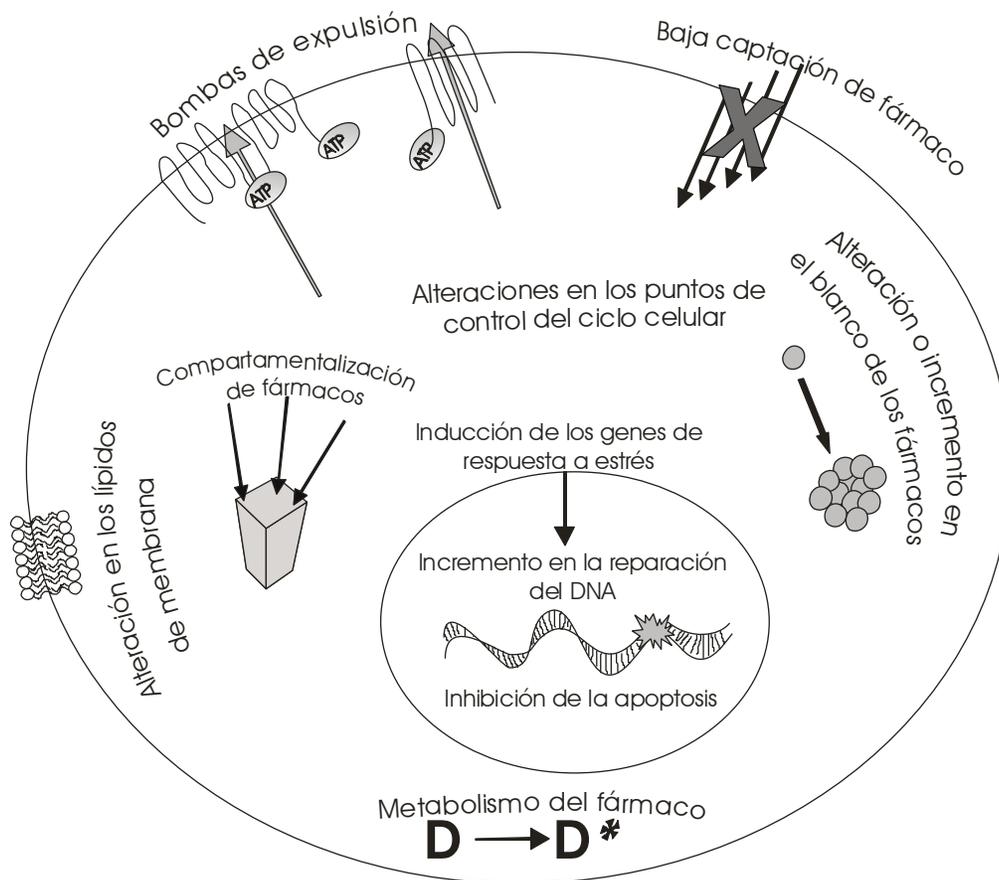


Figura 2. Mecanismos celulares relacionados con la resistencia a múltiples fármacos. Esta figura resume los procesos por los cuales una célula tumoral puede presentar resistencia a fármacos utilizados en quimioterapia. Las bombas de expulsión que se muestran de manera esquemática hacen referencia a la glicoproteína P, miembros de la familia MRP y BCRP. D y D* se refieren a las modificaciones que presentan los fármacos al ser inactivados.⁴⁶

Evidencias recientes referentes a los mecanismos moleculares y genéticos de resistencia a múltiples fármacos sugieren que existen tres fenotipos diferentes de resistencia a fármacos: **1)** resistencia a múltiples fármacos (mediada por glicoproteína P)³⁹⁻⁴¹; resistencia a múltiples fármacos no dependiente de glicoproteína-P: **2)** enzimas citoplasmáticas (Transferasas-S de glutatión (GST)⁴³ y *Lung resistance protein* (LRP)⁴⁴; **3)** proteínas transmembranales que funcionan como bombas de expulsión (transportadores ABC similares a gp-P), tales como la familia MRP^{41,42} (*Multidrug Resistance associated Protein*), BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*)^{47,480} y **4)** resistencia atípica a múltiples fármacos [enzimas involucradas en la topología del DNA (topoisomerasas del tipo I y II)].^{49,50} Estos cuatro fenotipos de resistencia tienen en común que

presentan un patrón cruzado de resistencia, pero difieren en las vías por las cuales se adquiere dicha resistencia.

La mayoría de los tumores NSCLC tienen resistencia intrínseca hacia los fármacos utilizados en los protocolos de quimioterapia, mientras que los SCLC son sensibles a los fármacos antes de adquirir el fenotipo de resistencia a fármacos.^{30,51,52}

En la actualidad existe una gran diversidad de fármacos utilizados en quimioterapia que han sido desarrollados para inhibir diferentes actividades celulares. Sin embargo, las células tumorales llegan a presentar diversos mecanismos de resistencia a fármacos, que pueden ser asociados con la actividad del fármaco utilizado en quimioterapia (*Tabla V*)

III.4.1 *Proteínas de membrana relacionadas con la resistencia a fármacos*

TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC son una extensa familia de proteínas que pueden acarrear una diversidad de compuestos a través de las membranas. La estructura general de estas moléculas consiste de dos regiones transmembranales (TM) las cuales constan de 6 dominios que atraviesan la membrana y cada región contiene un sitio de unión de ATP (ABC) localizado en la parte citoplasmática de la membrana. (*Figura 3*) La designación de transportadores ABC está basada en una región altamente conservada de unión de ATP (*ATP-Binding Cassette*), presente en todos los miembros de esta familia. Estos transportadores están muy conservados a lo largo de la evolución ya que se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes.^{45,52}

Existen 7 subfamilias de transportadores ABC, (ABCA-G), dicha clasificación está basada en las similitudes de la estructura génica, el orden de los dominios (dominios transmembranales (TM) y dominios de unión del nucleótido o DUN) y en el grado de homología de su secuencia tanto en los dominios transmembranales (TM) como en los dominios de unión del nucleótido (DUN). (*Figura3*)⁵³⁻⁵⁴

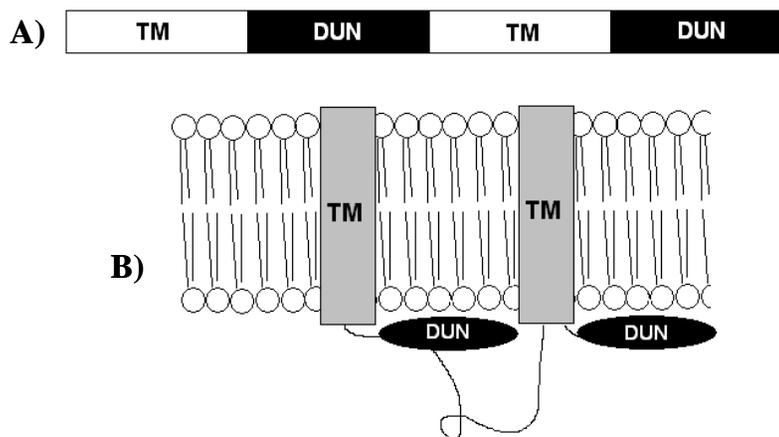


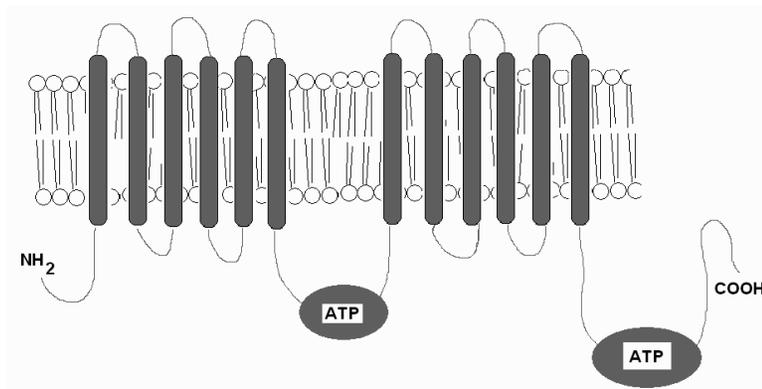
Figura 3. Diagrama característico de un transportador ABC. **A)** Organización típica de los transportadores ABC. Dominios transmembranales (TM) seguidos por dominios de unión al nucleótido (DUN). **B)** Esquema simplificado de la topología de los transportadores ABC. Las elipses oscuras representan la región de unión del ATP.^{53,54}

Se han descrito 48 transportadores ABC en humanos, de los cuales solamente 10 parecen estar asociados con el fenotipo de resistencia a fármacos. (Tabla VI y Figura 4).

Dentro de los principales transportadores ABC involucrados en la resistencia están los miembros de la familia de MRP (*Multidrug resistance associated protein*), BCRP y la primera molécula descrita como mecanismo de resistencia glicoproteína-P, proteína sobre la cual se enfoca este trabajo.

Los transportadores ABC no solo están relacionados con la resistencia a fármacos, se conocen por lo menos 14 transportadores involucrados con distintas enfermedades. ABCA4 está relacionado con la enfermedad de Stargardt, retinitis pigmentosa y distrofia macular, ABCB4 está relacionado con la colestasis en el embarazo, ABCB7 juega un papel en problemas de anemia con ataxia; ABCC2 síndrome Dubin-Johnson, etc. La fibrosis quística es una enfermedad mortal que se presenta principalmente en niños de población caucásica. CFTR es el transportador de iones cloro (Cl⁻) que produce la fibrosis quística y otros padecimientos como una secreción inadecuada de enzimas pancreáticas dando como resultado deficiencias en la nutrición, infecciones bacterianas en el pulmón y obstrucción de vías deferentes causando esterilidad en los hombres, etc.⁵³

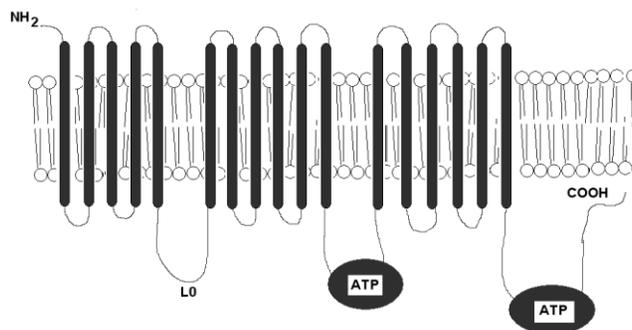
a)



EJEMPLOS

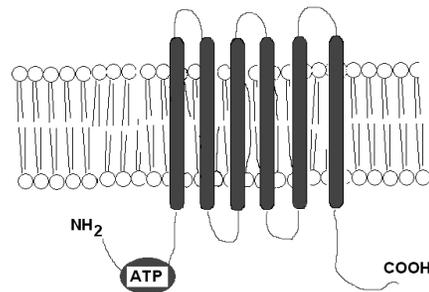
gp-P/MDR1 (ABCB1)
MRP4 (ABCC4)
MRP5 (ABCC5)
MRP7 (ABCC1)
BSEP/SPGP (ABCB11)

b)



MRP1 (ABCC1)
MRP2 (ABCC2)
MRP3 (ABCC3)
MRP6 (ABCC6)

c)



MXR/BCRP/ABCP
(ABCG2)

Figura 4. Estructura de los transportadores ABC relacionados con la resistencia a fármacos.

a) Transportadores ABC como glicoproteína-P (MDR1), con 12 dominios transmembranales (barras oscuras) y dos dominios de unión de ATP (esferas). **b)** Estructura de MRP1. Presenta dos dominios de unión de ATP y una región adicional con 5 dominios transmembranales en el extremo amino terminal, dando en total una proteína de 17 dominios transmembranales. **c)** Estructura representativa de los “medio-transportadores”. BCRP contiene seis dominios transmembranales y un sitio de unión de ATP en la región amino terminal.⁵⁴

Tabla VI. TRANSPORTADORES ABC HUMANOS.					
Gen	Otro nombre	Localización	Subfamilia	Expresión	Función
FAMILIA ABC "A"					
ABCA1	ABC1	9q31,1	ABC1	todo el organismo	expulsión de colesterol
ABCA2	ABC2	9q34	ABC1	cerebro	resistencia a fármacos
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13,3	ABC1	pulmón	
ABCA4	ABCR	1p22,1-p21	ABC1	fotoreceptores	expulsión de N-retinilideno-PE
ABCA5		17q24	ABC1	músculo, corazón, testículos	
ABCA6		17q24	ABC1	Hígado	
ABCA7		19p13,3	ABC1	vejiga, timo	
ABCA8		17q24	ABC1	Ovario	
ABCA9		17q24	ABC1	Corazón	
ABCA10		17q24	ABC1	músculo, corazón	
ABCA12		2q34	ABC1	Estómago	
ABCA13		7p11-q11	ABC1	baja expresión en todo el organismo	
FAMILIA ABC "B" (MDR/TAP)					
ABCB1	PGY1, MDR1	7q21	MDR	corteza adrenal, riñón y cerebro	resistencia a fármacos
ABCB2	TAP1	6p21		todas las células	transporte de péptidos
ABCB3	TAP2	6p21		todas las células	transporte de péptidos
ABCB4	PGY3, MDR3	7q21,1		Hígado	
ABCB5		7p14		todo el organismo	
ABCB6	MTABC3	2q36		Mitocondria	transporte de hierro
ABCB7	ABC7	Xq12-q13		Mitocondria	transporte de grupos Fe/S
ABCB8	MABC1	7q36		Mitocondria	
ABCB9		12q24		corazón, cerebro	
ABCB10	MTABC2	1q42		Mitocondria	
ABCB11	SPGP	2q24		Hígado	

T a b l a V I . T R A N S P O R T A D O R E S A B C H U M A N O S
(c o n t i n u a c i ó n)

Gen	Otro nombre	Localización	Subfamilia	Expresión	Función
FAMILIA ABC "C" (CFTR7MRP)					
ABCC1	MRP1	16p13,1	CF/MRP	pulmón, testículo	resistencia a fármacos
ABCC2	MRP2	10q24	CF/MRP	Hígado	expulsión de aniones orgánicos, resistencia a fármacos
ABCC3	MRP3	17q21,3	CF/MRP	pulmón, intestino, hígado	resistencia a fármacos
ABCC4	MRP4	13q32	CF/MRP	Próstata	transporte de nucleósidos, resistencia a fármacos
ABCC5	MRP5	3q27	CF/MRP	todo el organismo	transporte de nucleósidos, resistencia a fármacos
ABCC6	MRP6	16p13,1	CF/MRP	riñón, hígado	resistencia a fármacos?
CFTR	ABCC7	7q31,2	CF/MRP	tejido exocrino	canal iónico de cloro
ABCC8	SUR	11p15,1	CF/MRP	Páncreas	receptor de sulfonilurea
ABCC9	SUR2	12p12,1	CF/MRP	corazón, músculo	
ABCC10	MRP7	6p21	CF/MRP	baja expresión en todo el organismo	resistencia a fármacos?
ABCC11	MRP8	16q11-q12	CF/MRP	baja expresión en todo el organismo	resistencia a fármacos?
ABCC12	MRP9	16q11-q12	CF/MRP	baja expresión en todo el organismo	resistencia a fármacos??
FAMILIA ABC "D" (ALD)					
ABCD1	ALD	Xq28	ALD	Peroxisomas	
ABCD2	ALDL1,ALDR	12q11-q12	ALD	Peroxisomas	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	ALD	Peroxisomas	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24,3	ALD	Peroxisomas	
FAMILIA ABC "E" (OABP)					
ABCE1	OABP, RNS41	4Q31	OABP	ovario, testículo, vejiga	
FAMILIA ABC "F" (GCN20)					
ABCF1	ABC50	6q21,33	GCN20	todo el organismo	
ABCF2		7q36	GCN20	todo el organismo	
ABCF3		3q25	GCN20	todo el organismo	
FAMILIA ABC "G" (White)					
ABCG1	ABC8, White	21q22,3	White	todo el organismo	transporte de colesterol?
ABCG2	BCRP, ABCP, MXR	4q22	White	placenta, intestino	expulsión de toxinas, resistencia a fármacos
ABCG4	White 2	11q23	White	Hígado	
ABCG5	White 3	2p21	White	hígado, intestino	
ABCG8		2p21	White	hígado, intestino	

III.4.2. Resistencia clásica a múltiples fármacos mediada por Glicoproteína-P (gp-P, ABCB1)

Desde la década de los 70's, se obtuvieron las primeras evidencias sobre la asociación de la baja acumulación del fármaco y la expresión incrementada de una proteína de membrana plasmática de 170 kDa, a la cual se denominó glicoproteína-P.^{45,55}(Figura 4)

Las glicoproteínas P son dos proteínas de membrana que tienen la capacidad de transportar diversos sustratos a través de ella (Figura 5). A nivel génico son codificadas por dos genes denominados como MDR-1 (ABCB1) y MDR-3 (ABCB4)⁵³⁻⁵⁷.

Solo MDR-1 (gp-P), está relacionado con la resistencia a múltiples fármacos y la proteína MDR-3 (MDR-3) está relacionada con la secreción de ácidos grasos en la bilis, transporta fosfatidilcolina de la membrana interna a la externa y tiene actividad de flippasa.⁵⁵⁻⁵⁷

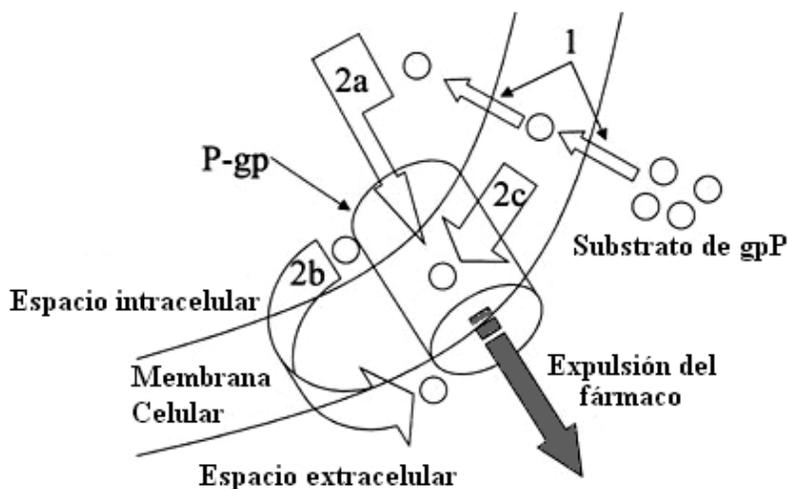


Figura 5. Mecanismos de acción de gp-P, propuestos para la expulsión de fármacos. **1)** Transporte pasivo del fármaco a través de la membrana celular. **2a)** Formación de canales hidrofóbicos (poros) entre los espacios intracelulares y extracelulares. **2b)** Actividad de flippasa en donde el fármaco es translocado (flipped) de la cara interna a la cara externa de la membrana celular. **2c)** "modelo de aspiradora" en el cual el fármaco interactúa con gp-P en la bicapa lipídica y subsecuentemente es expulsado de nuevo al espacio extracelular.⁵⁷

El gen MDR-1 (glicoproteína-P) se encuentra localizado en la región del cromosoma 17q21.1-22 y comprende una región de 120 kb la cual presenta los 28 exones que originarán a la proteína.⁵⁸ El gen MDR-3 se encuentra junto al gen de MDR-1 por lo que ambos se localizan en el cromosoma 17q21.1, este contiene 28 exones que codifican para un mRNA de 4.5 kb que genera una proteína de 1280 a.a. y tiene un peso ~170 kDa. Los genes MDR-1 y MDR-3 tienen un 80% de homología en su secuencia nucleotídica y un 76% de identidad en su estructura y secuencia de aminoácidos.^{58,59} (Figura 6)

La transcripción de MDR-1 está regulada por un elemento iniciador, ya que hasta la fecha se ha observado que todos los transportadores humanos relacionados con fármacos carecen de una caja TATA posicionada adecuadamente. La secuencia localizada entre -6 y +11 es suficiente para el inicio de la transcripción *in vitro* MDR-1 tiene una caja CCAAT invertida (-79 a -75) que interactúa con el factor de transcripción NF-Y y un elemento rico en GC (-56 a -43) que interactúa con los factores de transcripción Sp1 y Sp3. Sitios de unión AP-1 han sido descritos en los promotores de los genes MDR-1 o MDR-3 humanos en las posiciones -121 a -115. En estudios realizados en células de hámster, se encontró que la regulación de pgp1 (MDR-1 en humanos) en células sensibles a fármacos depende de un solo sitio de inicio de la transcripción y las células resistentes inician la transcripción por múltiples sitios, lo cual sugiere que las células tumorales presentan una mayor flexibilidad para su activación transcripcional. Otro elemento que parece estar relacionado con la transcripción de MDR-1 en células con resistencia a fármacos es el elemento MEF-1 (*MDR1 promoter-enhancing factor 1*) el cual se ha visto que activa la transcripción de MDR-1 a través de un elemento promotor (de -118 a -111). En la región promotora de MDR-1, en la posición -152 a -178 se ha identificado un elemento “heat-shock” que interacciona con el factor HSF (*factor heat-shock*) en especial con HSF-1; el factor HIF-1 (factor inducible por hipoxia se une a una secuencia localizada en -49 a -45 la cual se sobrelapa con el elemento GC relacionado con la expresión constitutiva e inducible de MDR-1. Otro elemento importante descubierto recientemente es SXR (receptor de xenobióticos) el cual puede regular la activación de la expresión de MDR-1 al ser estimulado por fármacos como el paclitaxel.⁵⁹⁻⁶¹

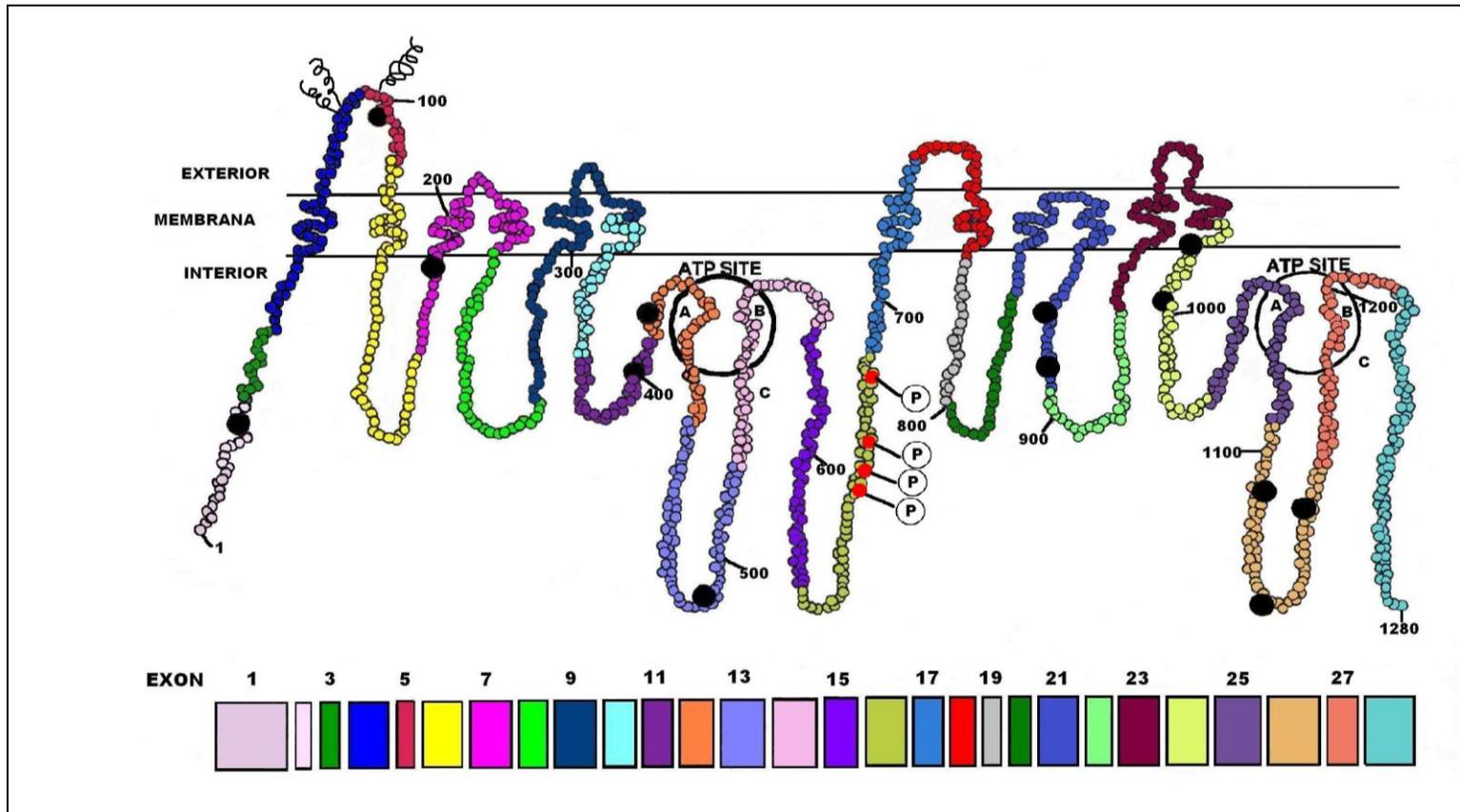


Figura 6. Representación esquemática de la glicoproteína-P (gp-P). Los sitios ATP (sitios de unión del nucleótido) están marcados con un círculo y los sitios de N-glicosilación están señalados con líneas en espiral. Los residuos de Serina en la posición 661, 667, 671 y 683 se han visto fosforiliados en estudios *in vitro*, por PKC o por PKA (círculos rojos). También se representan los SNPs que afectan el código de secuencia (círculos negros). En la parte inferior se representan los 28 exones del gen de MDR1, y la región codificada de gp-P en el mismo color de la estructura del modelo 2D de gp-P.⁶⁰

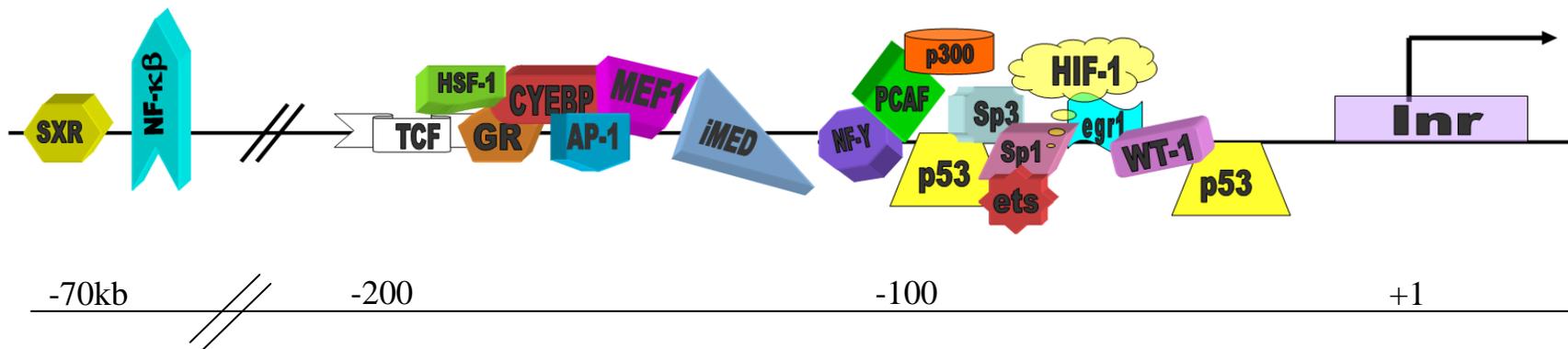


Figura 7. Factores de transcripción que regulan el promotor de MDR1. Esquema del promotor de MDR1 con los factores que se conoce que regulan la transcripción. Es importante notar que algunos sitios de unión se sobreponen, y esto es lo que permite que diferentes factores interactúen con estos sitios bajo diferentes condiciones. Con excepción de PCAF, el cual es reclutado al promotor de MDR1 a través de su interacción con NF-Y y proteínas Sp; todos los demás factores tienen una interacción directa con el DNA TCF/LEF se une a múltiples sitios del promotor MDR1, en el intervalo de -1813 a -261 , solo un sitio es mostrado en el esquema.⁶¹

El gen MDR1 codifica para un RNA mensajero de ~4000 nucleótidos. Una variedad de estímulos pueden incrementar los niveles de mRNA en diferentes células y tejidos, incluyendo condiciones de estrés e hipoxia, cambios en la matriz extracelular, factores de crecimiento, agentes xenobióticos, fármacos de quimioterapia, agonistas de PKC, inhibidores de gp-P como el verapamil y butirato de sodio, una hepatectomía parcial, etc. La glicoproteína P (MDR-1) es una proteína de 1280 a.a. con un peso de ~170 kDa; miembro de los transportadores ABC, ya que tiene una actividad de bomba de expulsión y para dicha actividad utiliza ATP. Esta proteína exhibe la estructura típica de los transportadores ABC, presentando una organización de 6+6 regiones transmembranales y dos sitios de unión a ATP.⁶⁰

La expresión de gp-P se ha encontrado en la superficie luminal de células epiteliales de los túbulos proximales del riñón, intestino grueso o delgado, hepatocitos biliares, barrera hematoencefálica, placenta, etc., esto sugiere que tiene un papel importante en la absorción y excreción de múltiples sustratos (toxinas y desechos), incluyendo fármacos y xenobióticos en tejidos normales. (*Tabla VII*)^{53,54,59}.

Múltiples mutaciones se han encontrado en las regiones que codifican para los dominios TM 5,6,11 y 12 las cuales se han visto que alteran la especificidad por los sustratos de gp-P. Sin embargo, también se han observado mutaciones en otros dominios transmembranales y en el sitio de unión del nucleótido que afectan la actividad de la bomba.

Cuando Hoffermeier, et al. realizaron estudios detallados de los exones de MDR1 y su región promotora, se identificaron 15 SNPs (polimorfismos de un nucleótido, *single nucleotide polymorphism*), tres de los cuales mostraron alteraciones de la proteína: uno en el exón 2 (Asn21Asp), en el exón 5 (Phe103Leu) y en el exón 11 (Ser400Asn). El cambio de un residuo aromático por un residuo lipofílico (Phe103Leu) podría contribuir con alteraciones en la proteína al interferir con su ensamblaje en la membrana. El SNP en el exón 11 (Ser400Asn) provoca el cambio de carga de la proteína. Este SNP se encuentra localizado en el citoplasma precediendo el primer dominio de unión de ATP. Hasta la fecha

no se ha observado una relación entre el genotipo de MDR-1 y la disposición de otros substratos de gp-P relacionado con la expulsión de fármacos de quimioterapia.⁶²⁻⁶⁴

Tabla VII. Substratos de Glicoproteína-P	
Agentes anticancerosos	Vinca alcaloides (vincristina, vinblastina) Antraciclinas (Doxorrubicina, epirubicina) Epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido) Paclitaxel (taxol) Actinomicina D Topotecan Mitramicina Mitomicina C
Agentes citotóxicos	Colchicina Emetina Bromuro de etidio Puromicina
Péptidos cíclicos y lineares	Granicidin D Valinomicina Factor α -de la feromona de la levadura
Inhibidores de proteasas de HIV	Ritonavir Indiavir Saquinavir
Otros	Hoechst 33342 Rhodamina 123 Calcein-AM

Aunque su mecanismo de acción no se conoce completamente se postula que el fármaco se une inicialmente a sitios específicos localizados en las asas citoplasmáticas de la proteína y posteriormente lo transporta activamente hacia el exterior. Sin embargo, se ha propuesto que la proteína puede actuar rápidamente, sacando el fármaco del espacio

intermembranal hacia el exterior antes de que llegue a citoplasma; en relación a esto se ha propuesto también que la proteína puede tener actividad de flipasa capaz de expulsar los fármacos. (*Figura 5*)

En la clínica oncológica se han observado tres clases de cáncer que expresan glicoproteína-P: **1)** aquellos que se derivan de tejidos en los cuales la expresión de gp-P es constitutiva (colon, hígado, corteza suprarrenal); **2)** los que obtienen su fenotipo de resistencia después de repetidas exposiciones a fármacos (leucemias, linfomas, cáncer de ovario y mama) y **3)** los cuales en los que los eventos de transformación *per se* son los responsables de la activación del gen MDR-1 (SCLC)^{54,58,65}.

Los tejidos pulmonares normales presentan niveles de expresión de gp-P relativamente bajos o indetectables, sin embargo, en las células tumorales sí se observa la expresión de gp-P principalmente en SCLC. En contraste con el cáncer de pulmón, en la mayoría del cáncer de colon y renal se tiene una alta expresión de gp-P lo cual se relaciona con la alta resistencia de estos tumores a los esquemas de quimioterapia. Sin embargo, muchas células que en tejido normal no expresaban gp-P al ser tratados con alguna terapia sobre expresan gp-P y así adquieren la resistencia a múltiples fármacos y como consecuencia una baja respuesta a la terapia. Generalmente, cuando se diagnostica la enfermedad el 6% de los pacientes expresan gp-P y después de un tratamiento con vincristina, doxorubicina y dexamentasona, el 85% de los pacientes tratados expresan gp-P.^{46,66}

Debido a la importancia de esta proteína en el tratamiento de diversas enfermedades (epilepsia, cáncer, VIH, etc.), las empresas farmacéuticas se han enfocado en desarrollar nuevos fármacos para inhibir su actividad. (*Tabla VIII*). Hasta la actualidad se han desarrollado bloqueadores de canales de calcio (verapamil, nifeldipin), fármacos hipotensivos (reserpine) antibióticos (gramicidin, cephalosporinas) inmunosupresores [ciclosporina A y sus derivados (PSC833/valsopodar)] y otros compuestos. La mayoría de

estos compuestos tienen como función inhibir competitivamente la unión o el transporte de los fármacos de quimioterapia.⁶⁷⁻⁷⁰

Tabla VIII. Moduladores de la actividad de glicoproteína-P	
Análogos de antraciclinas	Cioanomorfolin-doxorrubicina, N-acetildaunorrubicina
Antibióticos	Cefarantidina, Cefoperazona, Eritromicina
Fármacos contra la malaria	Cloroquinas, Quinidinas, Quinina
Bloqueadores de calcio	Verapamil, Nicardapina, Diltiazem
Inhibidores de calmodulinas	Clorpromazin, Trifluoroperazina
Fármacos cardiovasculares	Propanolol, Aminodarona, Dipyridamol
Inmunosupresores	Cilcosporina A, FK506, PSC833 (Valspodar)
Esteroides y derivados	Progesterona, Tamoxifen
"Surfactantes"	Tween80, Solutol HS-15

En algunos casos la expresión de la gp-P puede servir como un factor de mal pronóstico, sin embargo se ha demostrado en muchos casos, que la gp-P no determina por sí sola la resistencia al tratamiento en los pacientes.

III.4.3 Familia de MRP (Multidrug Resistance associated Protein)

En 1992 el grupo de Cole y colaboradores describieron el segundo transportador ABC más importante relacionado con la resistencia a fármacos. Esta proteína fue denominada como "proteína asociada a la resistencia de múltiples fármacos" (*MDR-associated protein, MRP*)^{71,72}

Hasta la fecha se han encontrado 8 proteínas homólogas de MRP las cuales han sido nombradas como MRP2-MRP9. Los miembros MRP8 y MRP9 fueron localizados recientemente y se sabe que tienen una estructura similar a MRP5, pero su importancia fisiológica aún no ha sido determinada. A partir de ahora, MRP será denominada como

MRP1 a lo largo del texto, para evitar confusión con los otros miembros de la familia. (Tabla VI y Figura 4)^{54,72,73}

MRP1 (ABCC1) comparte entre el 34 y 58% de identidad de secuencia con MRP2-MRP6, pero la topología de la proteína y su interacción con la membrana son muy similares en todos los miembros de la familia.

En adición a la estructura característica de los transportadores ABC (6+6 TM y 2 DUN), MRP1 tiene 5 regiones transmembranales adicionales en el extremo amino terminal, las cuales están unidas a las otras regiones transmembranales por una secuencia denominada como L0. La región adicional en el extremo NH₂, tiene importancia para la afinidad de aniones orgánicos, esta región adicional se presenta en MRP2, MRP3, MRP6 y MRP7. Los miembros MRP4, MRP5, MRP8 y MRP9 no presentan la región adicional, pero la secuencia L0 sí está conservada.

La mayoría de los transportadores MRPs están implicados en el transporte de fármacos cargados negativamente y fármacos neutros conjugados con glutatión, glucoronato o sulfato.

MRP4 funciona como una bomba de expulsión para purinas y análogos de nucleótidos, incluyendo algunos fármacos antivirales y agentes antitumorales como tiopurinas y MTX.

MRP5 confiere resistencia a purinas y análogos de nucleótidos, por otro lado MRP6 es un exportador de conjugados de glutatión y puede conferir una baja resistencia a agentes antitumorales, incluyendo etopósido, tenipósido, DXR y daunorrubicina.

MRP8 es el miembro más reciente de la familia de los MRPs, esta proteína está relacionada con la expulsión de fármacos, confiere resistencia a análogos de nucleótidos como 5-FU, ddC y PMEAs.⁷³

MRP1

MRP1 (ABCC1) es una proteína de membrana de 190 kDa que contiene 1531 aminoácidos, el gen se encuentra localizado en el cromosoma 16p13.1. La proteína MRP1

tiene el 15% de homología con glicoproteína-P (gp-P) (en la región amino y carboxilo respectivamente), se ha visto que MRP1 está más relacionada con el producto del gen de fibrosis cística, CFTR. MRP1 transporta aniones orgánicos y compuestos conjugados con glutatión, glucoronato y sulfato.

Se ha observado que al interrumpir la formación de GSH al inhibir la g-glutamylcisteína sintetasa con BSO (butionin sulfoxamina), las células se hacen más sensibles a antraciclinas, la carencia de glutatión (GSH) evita que el fármaco sea expulsado por MRP1. Varios modelos se han propuesto para la actividad conjunta de MRP1 y glutatión, desde la expulsión de fármacos conjugados con glutatión, el co-transporte del fármaco y GSH; y la presencia de GSH para la expulsión de fármaco.

Los fármacos que son buenos sustratos para MRP1 son: etopósido, doxorubicina y vincristina. Se ha observado un aumento en la concentración de MRP1 en líneas celulares expuestas a estos fármacos, las cuales presentan un fenotipo de resistencia a fármacos independiente de glicoproteína-P. Sin embargo los ratones *knockout* para MRP, solo presentan incremento en la sensibilidad a etopósido. Se han observado niveles elevados de la expresión de la proteína de MRP1 en cáncer de pulmón, principalmente en cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC). En cáncer de mama se ha reportado una significativa expresión de MRP1 evaluada por inmunohistoquímica (25-30%), y se relaciona con una pobre respuesta a la quimioterapia. La importancia concreta de MRP1 en clínica aún se desconoce.

No se ha identificado un inhibidor específico de MRP1 pero algunos fármacos como VX710, PAK-104P pueden tener una actividad antagonista para MRP1.

De los miembros de la familia de MRP solamente MRP2 (se describirá más adelante) y MRP3 parecen tener relevancia en el fenotipo de resistencia a fármacos. MRP1, MRP2 y MRP3 son capaces de transportar adriamicina, vincristina y MTX⁷³⁻⁷⁶

III.4.4 **BCRP** (***Breast Cancer Resistance Protein***)

Proteína de cáncer de mama relacionada con la resistencia o “*Breast Cancer Resistance Protein*” (BCRP/MXR/ABCP o ABCG2)^{41,77}.

El gen BCRP se encuentra localizado en el cromosoma 4q22, y comprende una región de 66 kb y consta de 16 exones. BCRP se traduce en una proteína de 655aa con un peso molecular de 72.6 kDa.

La proteína BCRP es considerada como un “medio transportador” ya que no presenta la estructura típica de los otros transportadores ABC (6+6 TM y 2DUN). BCRP contiene en su región amino terminal un dominio de unión a ATP y en su región carboxilo terminal presenta 6 dominios transmembranales, es por esto que es considerado como un “medio transportador” (*Figura 4*)^{77,78}.

La proteína BCRP tiene un peso de 70 kDa y su actividad de transportador la realiza al estructurarse como homodímero, en un complejo de 140 kDa. Por su relación con los transportadores de pigmentos de *Drosophila melanogaster*, los cuales funcionan como heterodímeros, cabe la posibilidad de que exista otro miembro de la familia ABCG que pueda formar heterodímeros con BCRP.

BCRP se encuentra expresado en placenta, en la membrana canalicular del hígado, intestino delgado, membrana apical del colon, pulmón, riñón, glándulas sudoríparas y en el endotelio de las venas y vasos capilares. En tejidos como cerebro, corazón, próstata, estómago, vejiga y cuello uterino se encontró una baja o indetectable expresión.⁷⁷

BCRP se ha observado en diferentes líneas celulares seleccionadas con mitoxantrona (MXT) y topotecan. El fenotipo de resistencia conferida por BCRP parece coincidir con el observado con glicoproteína-P (pobremente relacionadas filogenéticamente), sin embargo existen importantes diferencias en la eficiencia de los mecanismos. Los fármacos por los cuales BCRP presenta una alta afinidad para su expulsión son: mitoxantrona, topotecan, flavopiridol y prazosin. Célula que expresan BCRP presentan una resistencia cruzada con captotecina, inhibidor de topoisomerasa I. También

puede expulsar otros compuestos fluorescentes como bisantreno, antraciclinas, rodamina 123, etc.

La actividad de BCRP puede ser inhibida por furmitremorgin C (FTC) y GF120918.^{78,79}

III.4.5 *Resistencia a Múltiples Fármacos Relacionada con Diferentes Mecanismos.*

III.4.5.1 *Transferasas-S de Glutación*

En los humanos existen 8 subfamilias diferentes de transferasas-S de Glutación (GST), y comparten ~30% de homología de secuencia. Las familia se encuentran en distintos cromosomas y se nombran mediante letras griegas: alfa (α) en el cromosoma 6, mu (μ) en el cromosoma 1, theta (θ) en el cromosoma 22, pi (π) en el cromosoma 11, zeta (ζ) en el cromosoma 14, sigma (σ) en el cromosoma 4, kappa (κ) aún se desconoce su localización y xi (ξ) (también llamada omega) en el cromosoma 10. Dentro de cada familia existen múltiples isozimas. Estas enzimas adquieren su conformación activa al formar homodímeros.^{80,81}

Las GSTs se pueden localizar en todo el organismo, aunque su expresión en los tejidos es variable, lo cual sugiere que no están regulados de la misma manera. Por ejemplo: GST- π es abundante en placenta, pulmón, cerebro, eritrocitos y el cristalino del ojo, mientras que en hígado se presenta en bajas concentraciones y predomina la GST- α .⁸⁰

Las transferasas-S de glutación son enzimas que catalizan la conjugación del glutación con una variedad de compuestos tanto endógenos como exógenos, incluyendo fármacos y xenobióticos (ejem. pesticidas). Las GST comparten múltiples sustratos, sin embargo las GST α conjugan predominantemente peróxidos de hidrógeno, algunos esteroides, prostaglandinas, etc., pero las GST μ conjugan de manera preferente epóxidos, quinonas e hidrocarburos poliaromáticos, carcinógenos encontrados en el humo del cigarro, comida y productos de la combustión.

Existen múltiples evidencias donde se ha visto relacionada la GST con la desintoxicación de fármacos como agentes alquilantes, clorambucil, melfalan, mostazas nitrogenadas, ifosfamida y esteroides, principalmente cuando esta se encuentra en concentraciones elevadas. También se han visto relacionadas con el metabolismo y desintoxicación de bleomicina, mitomicina C, adriamicina y cisplatino. Sin embargo, no se han obtenido pruebas definitivas sobre si la GST está relacionada con la desintoxicación de antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasas del tipo I y II y antimicrotúbulos (taxol).⁸¹⁻⁸²

En pulmón la forma GST- π es la forma predominante, sin embargo GST- μ y GST- α también se expresan pero en baja concentraciones. 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 . La asociación de estas enzimas con el desarrollo del cáncer aún no está bien entendida, estudios en pacientes con SCLC presentaron una baja expresión de GST- π , lo cual se relaciona con su susceptibilidad. 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 (línea celular de SCLC), con respecto a su célula parental. Sin embargo, estos cambios no parecieron afectar el sistema de GSTs.⁸¹⁻⁸⁴

Variaciones en las concentraciones de glutatión (GSH) parecen estar relacionadas con la susceptibilidad hacia los fármacos. En pulmón se ha encontrado que niveles incrementados de GSH proporcionan a las células un fenotipo de resistencia.

Estudios iniciales se están realizando para utilizar a las GSTs como blancos terapéuticos. El primer modulador de la actividad de GST descrito es el ácido etacrínico (EA), el cual tiene la capacidad de inhibir a las GST- α , - μ y - π , al unirse directamente al sitio de unión del sustrato presente en la enzima, también depleta a su cofactor, GSH. El TLK199 es un compuesto que simula ser un análogo de GSH y que en concentraciones micromolares inhibe a la GST- π . TLK199, actúa como quimiosensibilizador, y se ha mostrado que potencia la toxicidad de varios fármacos en diferentes líneas celulares.⁸³⁻⁸⁵

III.4.5.2 *LRP/MVP (Lung Resistance Protein/Major Vault Protein)*

El complejo “vault” (conformación que semeja a una cúpula) está formado por múltiples copias de 3 proteínas: *Mr* 100, 000 (MVP), *Mr* 193, 000 [VPARP; Vault poly(ADP-ribosa)polimerasa], y *Mr* 24, 000 (TEP1; proteína asociada a telomerasa). Además de contar con una molécula de RNA no traducido de 88-141 bases. El tamaño del complejo es de 42 x 75 nm y tiene una masa molecular estimada de 13 MDa.^{86,87} El complejo en cuanto a composición, morfología y dimensión esta conservado a lo largo de la escala filogenética (protozoarios, moluscos, equinodermos, peces, aves y mamíferos). Sin embargo hasta la fecha no se ha encontrado en *Saccaromyces cerevisiae* y probablemente no están presentes en *Caenorabditis elegans*, *Drosophyla melanogaster* y *Arabidopsis sp.*

El gen de la proteína LRP/MVP está localizado en el cromosoma 16p11.2, codifica para un transcrito de 2840 nucleótidos y una proteína de 893aa con un peso molecular de 110 kDa.^{86,87}

Las proteínas *vaults* fueron descritas por primera vez a mediados de los 80's, pero hasta la fecha se desconoce su función exacta. Sin embargo su forma de barril hueco y su localización subcelular indican que pueden tener una función de transporte intracelular principalmente núcleo-citoplasma, aunque también se han visto asociadas a los microtúbulos del citoplasma, por lo cual se ha propuesto que las *vault* pueden transportar los fármacos del núcleo al citoplasma y en el citoplasma llevarlos hacia vesículas o trabajar en asociación con un transportador ABC.

Gracias a experimentos de distribución realizados con antraciclina fluorescente se propuso que las *vault* actuaban transportando los fármacos lejos de sus blancos subcelulares al extraer o expulsar los fármacos del núcleo y/o retenerlos dentro de vesículas de exocitosis.^{103,104}

La proteína principal “vault” (*major vault protein*, MVP) o LRP (“*lung resistance protein*”) fue descrita por primera vez en una línea celular de cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC), que carecía de gp-P.⁸⁷ Posteriormente se encontró en múltiples líneas celulares que no habían sido expuesta a fármacos. En estas líneas se presentaba una

correlación entre la expresión de LRP y la resistencia intrínseca hacia doxorubicina, vincristina y compuestos de platino, en algunos casos se presentaron niveles elevados de la expresión de las *vault*. En células de colon que sobrepresan MVP/*vaults* las antraciclinas son sacadas del núcleo de una manera dependiente de *vault*.⁸⁸⁻⁹⁰

III.4.6 *Resistencia atípica a múltiples fármacos. Enzimas involucradas en la Topología del DNA (Topoisomerasas del tipo I y II)*

Las funciones principales de las topoisomerasas son: (a) resolver los problemas topológicos del DNA, tales como el superenrollamiento y la concatenación y, (b) separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis.^{49,91,92}

En los humanos existen dos tipos Topoisomerasas del tipo I y del tipo II, las cuales no solo tienen distintas funciones sino también una localización intracelular diferente. (Tabla IX)^{49,5091-93}

La Topoisomerasa I, es una proteína monomérica de ~91 kDa compuesta de 765a.a., codificada por un gen localizado en el cromosoma 20q12-13.1. Esta proteína se expresa de manera constitutiva en todas las células y su expresión a lo largo del ciclo celular es constante.

La Topoisomerasa I (topo I) es la enzima encargada de realizar el corte y reunión de una cadena de DNA^{94,95}

La actividad de la Topoisomerasa I se ve inhibida por los fármacos utilizados en quimioterapia: captotepcina (CPT) y sus derivados (Tabla V). Estos fármacos actúan estabilizando el complejo de la topoisomerasa I con el DNA permitiéndole a la enzima su actividad de endonucleasa, pero impidiendo que la enzima ligue de nuevo la cadena de DNA. Esto provoca alteraciones en la síntesis de DNA y rompimientos en la cadena de DNA.

En células tumorales con fenotipo de resistencia a fármacos se ha observado una disminución en la expresión del transcrito (mRNA) de Topoisomerasa I; así como la presencia de mutaciones puntuales. También se han descrito mutaciones en la región del gen que codifica para el extremo COOH de la proteína, región donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima, afectando de esta forma su actividad. En algunos casos también se muestran bajos niveles de actividad de la proteína.⁹⁶⁻⁹⁹

Tabla IX. Principales características de las Topoisomerasas humanas			
CARACTERÍSTICAS	Topoisomerasa I	Topoisomerasa IIα	Topoisomerasa IIβ
Cromosoma	20q11.2-13.1	17q21-22	3p24.2
Tamaño	91kDa.	174 kDa	183 kDa
Subunidades	monómero	homodímero	homodímero
Localización	Nucleolo	Núcleo	Nucleolo
Dominio de unión al ADN	si	si	si
Capacidad de cortar y unir el ADN	si	si	si
No. de cortes en la cadena de ADN	Uno	Dos (cuatro pares de bases superpuestas)	Igual que topo II α
Requerimiento de energía	no	ATP	Igual que topo II α
Requerimiento de metales	no	Mg	
Ciclo celular	Se expresa durante todo el ciclo, elevada en fase S para transcripción.	Incrementa durante la fase S y está elevada durante G ₂ y mitosis. Baja en células diferenciadas.	Constante
Inhibidores	camptotecina	VP-16, VM-26, DXR otros.	Igual que topo II α

En las células humanas, se han identificado dos isoformas de Topoisomerasa II, denominadas alfa (α) y beta (β). La homología entre ambas Topoisomerasas α y β , es >80%, mientras que a nivel de aminoácidos la similitud es de ~72%. A pesar de la gran similitud entre los DNA y mRNA, ambas isoformas son diferentes bioquímicamente.

El gen de la Topoisomerasa II α se localiza en el cromosoma 17q21-22. Transcribe un RNA mensajero de 4593 nucleótidos, que se traduce en una proteína de 1531 aminoácidos (174 kDa). El gene de la Topoisomerasa II β está localizado en el cromosoma 3p24.2; y transcribe un RNA mensajero de 5189 nucleótidos y produce una proteína de 1626 aminoácidos con un peso molecular de 183 kDa. El producto de cada uno de estos genes se estructura como un homodímero funcional. (Tabla IX)^{50,93,100-102}

La actividad catalítica de la Topoisomerasa II obedece a diferentes mecanismos finamente regulados, desde la expresión génica hasta cambios pos-traduccionales, principalmente de fosforilación.^{50,93} En un estado de hiperfosforilación, las enzimas son transportadas inmediatamente al núcleo, la hiperfosforilación aumenta la actividad y afinidad de la proteína por el DNA; mientras que en un estado de hipofosforilación estas residen en el citoplasma y presentan una baja actividad.¹⁰³

Las Topoisomerasas II (α y β) son blanco de un gran número de fármacos terapéuticos incluyendo antiparasitarios, antimicóticos, antivirales y antineoplásicos.¹⁰³ (Tabla V) Algunos fármacos se unen directamente a la enzima, estabilizando el complejo Topoisomerasa II-DNA e interfiriendo con la capacidad enzimática para religar las cadenas de DNA. Esto da como resultado que se presenten múltiples cortes en la molécula de DNA (estos fármacos pueden ser intercaladores o no intercaladores). Existen otros fármacos que no son intercaladores, pero estabilizan la formación del complejo topoisomerasa-DNA, interfieren con la ligación del DNA. La actividad de dichos fármacos y la formación de complejo topoisomerasa-DNA, están íntimamente relacionados con el intercambio de cromátidas hermanas, recombinaciones ilegítimas y también inhiben la separación de los cromosomas.

Etopósido, doxorubicina y mitoxantrona son inhibidores tanto de topoisomerasa II α como de topoisomerasa II β .

Actualmente, existen varias evidencias que muestran que las alteraciones en las Topoisomerasas II son responsables para la adquisición del fenotipo de resistencia a fármacos. Las alteraciones de las Topoisomerasas II descritas que se asocian con la resistencia a fármacos son: a) una disminución en la concentración de la enzima; b)

mutaciones que alteran su unión con el DNA o con el inhibidor, y c) una localización citoplasmática de la Topoisomerasa II α .^{104,105}

Todos estos mecanismos de resistencia han sido estudiados en cultivos de monocapas, describiendo cómo las células en cultivo pueden adquirir resistencia a diversos fármacos. Sin embargo, el fenómeno de resistencia no sólo se observa en cultivos de células que han sido expuestas de manera recurrente a diversos fármacos, sino también dicho fenómeno se presenta *in vivo*, en pacientes que no han sido tratados previamente con ningún fármaco. Por más de 15 años se han buscado nuevas metodologías con la finalidad de encontrar un modelo intermedio entre los cultivos en monocapa y los tumores de los pacientes., que pudiera explicar la biología del tumor en un sistema *in vitro*.¹⁰³⁻¹⁰⁶

III.5. RESISTENCIA MULTICELULAR

La gran mayoría de los estudios de resistencia múltiple a fármacos, han sido realizados en sistemas de cultivo en monocapa (2D). Sin embargo, los resultados obtenidos en estos sistemas de cultivo pocas veces permiten predecir una respuesta clínica del tumor. En parte, la explicación podría estar dada por las diferencias que existen entre las interacciones celulares en una monocapa (2D), en comparación a las que se presentan cuando las células forman parte de la arquitectura del tejido tumoral, así como las condiciones del microambiente tumoral. De esta manera y con la finalidad de tener una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia múltiple a fármacos observados en los tumores sólidos, se han desarrollado nuevas técnicas de cultivo que implican la formación de agregados celulares, conocidos como microesférulas (3D).^{107,108} (Figura 8).



Figura 8. Microscopía electrónica de células tumorales de pulmón, crecidas en microesférulas sobre un soporte de agarosa durante 72 hrs.

Originalmente el desarrollo de las microesférulas fue propuesto con la idea de acercarse más a las primeras etapas de crecimiento avascular de un tumor. Ahora se sabe que cuando una línea celular tumoral es crecida como microesférula, mantiene varios de los procesos celulares de un tumor, tales como la expresión de proteínas de adhesión o de secreción que normalmente no son observables cuando las células se cultivan como monocapa.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

En el caso particular de la resistencia a fármacos, el modelo de microesférula presenta las siguientes ventajas:

- a) Permite evaluar la actividad de los fármacos de quimioterapia en un modelo *in vitro*, con algunas características observadas en los tumores.
- b) Debido a que las células y su microambiente son diferentes, permiten estudiar cuales mecanismos de resistencia a fármacos están presentes en los tumores.
- c) Al obtener un modelo con características propias de un tumor en un sistema *in vitro*, se puede evaluar la difusión, metabolismo, etc. de los fármacos y la

respuesta de las células bajo estas condiciones y así, hacer una predicción del comportamiento clínico de los tumores ante la acción de la quimioterapia.

- d) Permite evaluar otros mecanismos que previamente no se consideraban como factores relacionados con la resistencia a fármacos, tales como las modificaciones en el citoesqueleto, uniones intercelulares, proteínas de matriz extracelular, etc.¹⁰⁸⁻¹¹¹

Con base en lo anterior se puede señalar que el uso de microesférulas de células tumorales presenta una alternativa de estudio en la resistencia a fármacos de los tumores. Así, una de las observaciones más frecuentes en cultivos de microesférulas, resulta del hecho de que la respuesta a fármacos se ve disminuida notablemente, dando como resultado un incremento notable de la resistencia. Este fenómeno es conocido como resistencia multicelular y parece estar más cercano al tipo de respuesta observada en la resistencia clínica que el obtenido por líneas celulares dispersas en monocapa, ya que en este tipo de cultivo las células presentan sensibilidad a los fármacos y en los tumores no se observa esta respuesta.¹¹²⁻¹¹⁴

En un principio las microesférulas fueron utilizadas como modelo para estudiar las primeras etapas del desarrollo tumoral y nuevas terapias contra el cáncer, actualmente también se emplean en estudios sobre los mecanismos que controlan la invasión tumoral, metástasis y la angiogénesis, así como la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular.¹¹⁵⁻¹¹⁸

IV. ANTECEDENTES DEL PROYECTO.

En la adquisición del fenotipo de resistencia a fármacos, se ha sugerido que la gp-P desempeña un papel relevante. Sin embargo, una relación directa de gp-P con la resistencia clínica solo se ha observado con algunos tumores hematológicos. Así, en tumores sólidos el papel que desempeña gp-P como mecanismo principal para la adquisición de la multi-resistencia, aun no está determinado.

Con la finalidad de establecer que en los cultivos en monocapa (2D) y en microesférulas (3D) se contara con el mismo número de células, se realizaron ensayos con MTT bajo dos condiciones diferentes: variación en el número de células crecidas durante 72 hrs; y el mismo número de células crecidas en diferentes tiempos (24, 48, 72 hrs). Ambos resultados demostraron que en los dos tipos de cultivo se contaba con el mismo número de células y que los experimentos realizados en estos modelos podían ser comparables.

Como antecedentes a este trabajo se encontró que dos líneas celulares de cáncer de pulmón (INER-37 e INER-51) mostraron una sensibilidad variable a un grupo de fármacos, y cuando fueron crecidas como microesférulas (3D), incrementaron varias veces su resistencia en comparación con su cultivo en monocapas (2D). (Tabla X)

Tabla X. Comparación de los valores de IC₅₀ entre dos líneas celulares de cáncer de pulmón crecidas como monocapas (2D) o microesférulas (3D)				
Fármaco	INER-37-2D (μM).	INER-37-3D (μM).	INER-51-2D (μM).	INER-51-3D (μM).
VP-16	40	>500	3	>500
VM-26	14.2	>500	1	>500
DXR	3	>100	6	87
CPT	11.6	>100	0.5	>100
5-FU	300	>500	0.8	>500
MTX	300	>500	1.6	>500
ARA-C	300	>500	0.4	>500

Con la finalidad de comprender cuales eran los mecanismos relacionados con la resistencia multicelular, se analizó el patrón de expresión de distintos genes que pueden relacionarse con la multiresistencia (topoisomerasas del tipo I y II, MRP1) incluyendo MDR-1. Los resultados encontrados por el análisis de RT-PCR mostraron variación en la expresión génica que dependió de la línea celular (INER-37 e INER-51); sin embargo, como microesférulas (3D), las dos líneas celulares de pulmón expresaron MDR-1 y su producto (gp-P). En el caso de MRP1, INER-37 se presentó una disminución en la expresión de MRP1, mientras que INER-51 no expresó el gen en ninguna forma de cultivo (monocapa o microesférula). INER-37 no presentó cambios en la expresión de Topoisomerasa II α , pero se presentó un aumento en la expresión de Topoisomerasa II β en cultivos de microesférula. En el caso de INER-51 las topoisomerasas tienen una baja expresión en cultivos de monocapa, pero en cultivos de microesférulas la topoisomerasa II α no se expresa, pero topoisomerasa II β aumenta su expresión.¹¹⁹

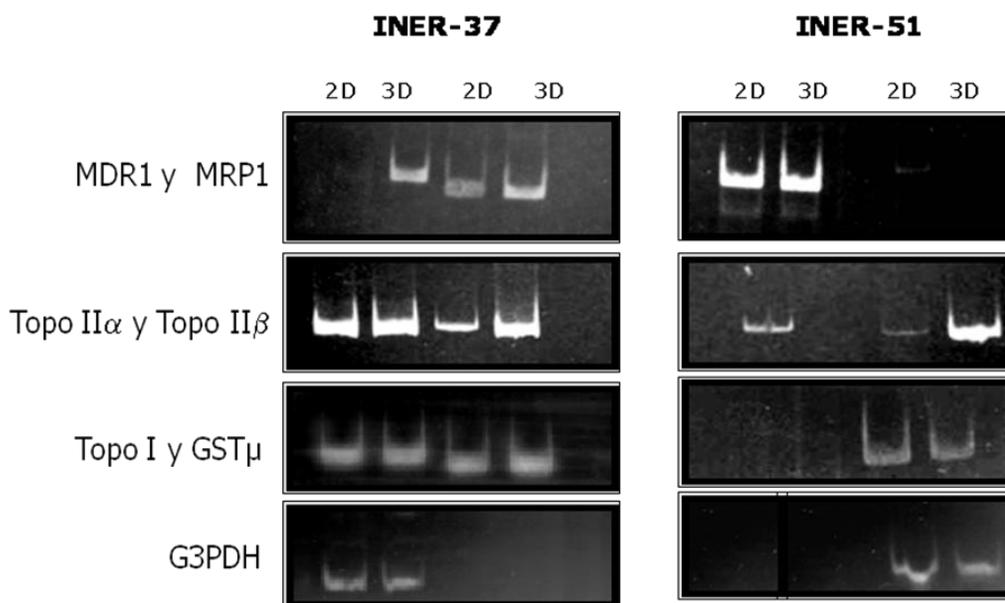


Figura 9. Expresión del transcrito de los genes relacionados con la resistencia a fármacos en la línea celular INER-51. MDR1 y MRP; Topoisomerasa (Topo) II α y II β ; transferasas-S de glutatió μ n (GST- μ) y Topo I. G3PDH fue utilizado como control de expresión. Este experimento se realizó mediante análisis de RT-PCR.

De esta manera, las primeras evidencias sugirieron que la gp-P podría ser responsable de la resistencia multicelular en las líneas celulares estudiadas. No obstante, hay que recordar que la resistencia a fármacos no está dada por un solo mecanismo, sino que esta se presenta de forma multifactorial, por lo cual se requirió de una línea celular en donde otros mecanismos de resistencia múltiple no se presentaran. De esta manera, la línea celular seleccionada fue INER-51, ya que en ella no se encontró expresión del gen MRP1, ni del gen de GST- μ (transportador de aniones, que trabaja junto con MRP1). En el caso de las topoisomerasas de tipo I y II, se sabe que modificaciones de la enzima o cambios en su expresión están relacionadas con la resistencia a fármacos muy específicos (camptotecina y etopósido respectivamente), y no a una variedad de fármacos (resistencia a múltiples fármacos).¹¹⁹

V. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se han realizado una serie de esfuerzos conjuntos para comprender el origen, comportamiento y respuesta de los tumores hacia una diversidad de factores.

La mayoría de los estudios realizados para comprender cuales son los factores relacionados con el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos han sido efectuados en cultivos de monocapas, sin embargo, hasta la fecha los resultados que se han obtenido con los experimentos *in vitro* no parecen tener relación con lo observado en la clínica oncológica de los tumores sólidos. No obstante estos estudios han proporcionado las herramientas para establecer algunos de los mecanismos más importantes para el desarrollo del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, tal es el caso de glicoproteína-P, MRP, topoisomerasas, entre otros.

Desde que glicoproteína-P fue descubierta en células con fenotipo de resistencia a fármacos y no en la célula parental sensible a fármacos se atribuyó que la simple presencia de glicoproteína-P era responsable de dicho fenotipo. Lo cual parecía correlacionar con lo observado con otras líneas celulares seleccionadas con diferentes fármacos. Sin embargo, en la experiencia clínica, no parece haber dicha relación.

El desarrollo de nuevos modelos de estudio *in vitro* como las microesférulas, ha permitido estudiar diferentes fenómenos presentes en las primeras etapas avasculares de los tumores sólidos como angiogénesis, la progresión del tumor, etc.

El empleo de dichos modelos proporciona una herramienta para estudiar los mecanismos relacionados con la resistencia a fármacos observados en cultivos de monocapa y plantear la relevancia que tiene el mecanismo clásico de resistencia a fármacos, glicoproteína-P, en la adquisición del fenotipo de resistencia a fármacos en estructuras que asemejan las condiciones de un tumor.

VI. HIPÓTESIS

La formación de estructuras de microesférulas, incrementará la resistencia multicelular a fármacos, la cual dependerá de la actividad de mecanismos de resistencia mediados por gp-P, MRP, BCRP, etc.

VII. OBJETIVOS

VII.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de glicoproteína-P o algún otro mecanismo de resistencia a fármacos que expliquen la adquisición de resistencia múltiple, en cultivos de microesférulas (3D), en la línea celular de cáncer de pulmón INER-51.

VII.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterización de la línea celular INER-51, así como la expresión de transcritos de genes involucrados en la multiresistencia a fármacos.
- Analizar los cambios en la resistencia múltiple a fármacos por el tipo de cultivo en monocapa (2D) o en microesférulas (3D)
- Analizar y caracterizar los cambios de la actividad de gp-P, como uno de los principales mecanismos involucrados en la resistencia multicelular a fármacos en líneas celulares de cáncer de pulmón.
- Identificar si existen otros mecanismos que participen activamente y coadyuven a la adquisición de la resistencia multicelular.
- Analizar si el patrón de resistencia a fármacos debido a este/estos mecanismos se ve modificado por el tipo de cultivo en monocapa o microesférulas.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1. CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES

Para este estudio se utilizaron las siguientes líneas celulares:

La línea celular de cáncer de pulmón INER-51 (I-51) fue obtenida en este laboratorio a partir del derrame pleural de un paciente con diagnóstico de adenocarcinoma el cual no había recibido tratamiento previo con fármacos. El análisis citológico mostró que la línea celular INER-51 era negativa para las pruebas de citoqueratina y PAS (mucopolisacáridos) por lo cual se describió como un adenocarcinoma pobremente diferenciado. La línea celular INER-51 presenta una baja adherencia hacia la matriz de las cajas de cultivo, creciendo en suspensión y formando estructuras en forma de racimos.

Como controles de experimentación se utilizaron diferentes líneas celulares. La línea celular A498 es derivada de carcinoma de riñón humano obtenida del ATCC (HTB 44, Rockville, MD).

Se utilizaron otras líneas celulares como HeLa (cáncer cervix) e INER37 que es una línea celular obtenida en este laboratorio a partir del derrame pleural de un paciente con adenocarcinoma de pulmón diferenciado, con presencia de mucopolisacáridos.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en cultivo de monocapa con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, Co.) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio; permaneciendo en incubación a 37 °C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

VIII.2. OBTENCIÓN DE LA CLONA DE INER-51 CON FENOTIPO gp-P^{neg} DENOMINADA I-51/PSC

A partir de un cultivo de monocapa de INER-51 en fase de crecimiento logarítmico se tomaron 1.23×10^6 céls/5 ml y se sembraron en una caja de cultivo T25. Después de 24 h

se adicionó 5 μM de doxorubicina (DXR, Farmitalia-Carlo Erba) y 5 μM de PSC833 (valsopodar, Novartis) para realizar una coselección de fármacos.¹³⁹ Las células se mantuvieron durante 96 h con el medio selectivo hasta que se obtuvo ~20% de sobrevivencia, posteriormente se lavaron e incubaron en medio libre de fármacos durante 10 días. Cuando las células recuperaron su velocidad de proliferación y el cultivo se encontraba en etapa de crecimiento logarítmico, se les agregó de nuevo fármacos (5 μM de DXR y PSC833). Después de tres meses de selección se obtuvieron varias clonas que presentaban fenotipo de resistencia hacia DXR. La línea celular con fenotipo gp-P^{neg}, fue denominada como I-51/PSC. La expresión de MDR-1 fue analizada por de RT-PCR y evaluado por un corrimiento electroforético en un gel de acrilamida al 7.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con una lámpara de luz ultra violeta. Al utilizar marca radioactiva (³²P-ATP) para el análisis por RT-PCR el gel fue expuesto a una placa autorradiográfica.¹²⁰

VIII.3. CULTIVOS CELULARES

a) *Cultivos en monocapa.*

A partir de cultivos en monocapa se obtuvieron las células en suspensión e independientes por actividad de la tripsina-EDTA (Gibco, Carlsband, California), se cuantificaron en un hemocitómetro y se determinó su viabilidad celular con ayuda del colorante vital azul tripan (Sigma). Las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos (Nalgen Nunc International.) a una concentración de 5×10^3 céls. en 180 μl de medio de cultivo/pozo e incubadas durante 72 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

b) *Cultivos en microesférulas.*

Para obtener las microesférulas (3D), las placas de cultivo (96 o 24 pozos) fueron cubiertas con agarosa al 1% (50 y 250 μl respectivamente). Una vez gelificada la agarosa se colocaron 5×10^3 ó 350×10^3 células por pozo (respectivamente), dejando en incubación durante 72 h a 37 °C hasta formarse los agregados celulares (*Figuras 8 y 10*).

VIII.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los cultivos en monocapa (2D) o en microesférulas (3D) fueron crecidos en medio de cultivo RPMI en placas de 96 pozos. A cada pozo se le adicionaron 20 μ l de uno de los siguientes fármacos: DXR, VP16, o MTX a distintas concentraciones (desde 3.12 μ M hasta 50 μ M). Después de 72 h de incubación se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se les adicionaron 20 μ l de MTT. Los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO por agitación después de 4 h de incubación ^{121,122} y las placas analizadas por un lector de ELISA a 540 nm (Labsystem Multiskan MS). Los experimentos fueron realizados por sextuplicado y los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes.

VIII.5. ANÁLISIS POR RT-PCR

El RNA total se extrajo de las líneas celulares previamente descritas (INER-51, A498, HeLa, INER-37, etc.) (1×10^6 células) con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total fue almacenado con H_2O_{DEPC} a -20 °C. La síntesis de cDNA se hizo con 5 μ g de RNA y 20 μ l de una mezcla de reacción que contenía: 50 mM Tris-HCl (pH8.3), 75 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.125 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato, 0.5 μ g de oligo dT y 400 unidades de transcriptasa reversa (Superscript II _{RT}-GIBCO). La reacción fue detenida a 37 °C durante 60 min con 2.2 U de RNAsa libre de DNAsas.

La PCR fue realizada de acuerdo al siguiente protocolo: 50 ng de cDNA se incubaron con una mezcla de reacción que contenía: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2 mM de $MgCl_2$, 250 μ g/ μ l de BSA, 50 nM de oligonucleótidos específicos (*Tabla XI*), 400 μ M dNTPs y 2.5 U Taq DNA polimerasa. La amplificación fue realizada en un termociclador (Programed Therma Controller, modelo PTC-100, MJ Research, INC. Watertown, MA. USA) por 35 ciclos con desnaturalización del DNA a 94 °C por 1 min, alineación a 55-60 °C por 2 min y polimerización a 72 °C por 3 min. La amplificación del cDNA de G3PDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) fue utilizada como control positivo de la

reacción bajo las mismas condiciones experimentales. Los productos de las reacciones se corrieron en un gel de acrilamida al 7.5% en amortiguador TBE pH 8.3 (89 mM Tris-borato y 2 mM EDTA pH 8) y se visualizaron con bromuro de etidio.

Tabla XI. Oligonucleótidos de amplificación para experimentos de RT-PCR

Genes	Secuencia de los oligonucleótidos	Temperatura de alineado (°C)	[MgCl₂] (mM)	Producto (Pb)	Referencia
MDR-1	5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3' 5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA -3'	55	0.5	150	121
MRP1	5'-TCT CTC CCG ACA TGA CCG AGG-3' 5'-CCA GGA ATA TGC CCC GAC TTC-3'	60	0.5	140	121
BCRP	5'-CAA CCA TTG CAT CTT GGC TG-3' 5'-CAA GGC CAC GTG ATT CTT CC-3'	55	0.5	220	77
G3PDH	5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA-3' 5'-GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA-3'	63	0.75	110	121
GST-μ	5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG -3' 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG-3'	60	0.75	250	124
Topo I	5'-AAG CAG AGG AAG TAG CTA CG-3' 5'-GCT CAA CTG TTT CCG AGC TT-3'	56	1	206	125
Topo IIα	5'-CTGAAGGAAGCCCTCAAGAAG-3' 5'-GGTCTTAGGTGGACTAGCATC-3'	63	2.5	343	126
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	126

VIII.6. ANÁLISIS FUNCIONAL DE gp-P

a) *Ensayo de retención de doxorrubicina*

Se realizaron cultivos en monocapa y en microesférulas con células INER-51 y/o I-51/PSC, los cuales después de ponerles medio fresco, se les agregaron diferentes

concentraciones de (DXR) [desde 5 μM hasta 45 μM] y permanecieron en incubación durante 30 min a 37 °C. Terminada la incubación con el fármaco, las microesférulas se lavaron con PBS, se fragmentaron mediante un proceso mecánico y el extracto celular se trató con metanol-HCl 0.2 N (1:1). La fluorescencia de la doxorubicina (DXR) concentrada en el interior de las células fue determinada en una excitación de 427 nm y una emisión de 580 nm (Photon Technology Internacional, Princenton, New Jersey, EUA)¹²⁷

b) Ensayo de expulsión de doxorubicina

Se procedió a incubar las células INER-51 según lo antes descrito en el ensayo de retención de DXR, agregando una [30 μM] de DXR a todos los cultivos, transcurridos los 30 min a 4 °C, con el fármaco, las células fueron lavadas con PBS frío y colocadas en presencia de medio libre de fármaco. Los cultivos permanecieron en incubación a 37 °C, y fueron obtenidos por intervalos de tiempo de 5 min durante un periodo total de 45 min. Las células fueron tratadas como se mencionó anteriormente y la concentración interna fue determinada por fluorometría, según se describió previamente.

c) Inhibición de la actividad de gp-P

A cultivos de microesférulas (3D) de la línea celular INER-51 en medio de cultivo RPMI-1640 se les adicionó uno de los siguientes inhibidores de gp-P: ciclosporina A [Cs-A] Sandoz, verapamil [VRP] Sigma ó PSC833 [valsopodar] Novartis a diferentes concentraciones (de 30 hasta 120 μM). Después de 1 h de incubación se agregó DXR a una concentración de 30 μM final, dejando en incubación durante 30 min. Las microesférulas se lavaron con PBS y el extracto celular se trató con metanol-HCl 0.2 N (1:1). La fluorescencia de la doxorubicina (DXR) concentrada en el interior de las células fue determinada en una excitación de 427 nm y una emisión de 580 nm (Photon Technology Internacional, Princenton, New Jersey, EUA)¹²¹

d) *Retención de rhodamina 123*

Con el fin de evaluar la actividad de gp-P con otro sustrato (colorante rhodamina 123) en las líneas celulares INER-51 e I-51/PSC se sembraron 35×10^4 células por pozo (placas de 24 pozos). A cada pozo se agregaron diferentes concentraciones de rhodamina 123 (Rho123) (intervalo de 5 a 45 μM) por una hora, posteriormente los cultivos se lavaron con PBS y la rhodamina intracelular se extrajo al tratar el extracto celular con metanol-HCl 0.2 N (1:1). La fluorescencia fue medida en una excitación de 480 nm y una emisión de 510 nm.

e) *Retención de doxorubicina con inhibidores de ATP*

Los cultivos en monocapa o microesférulas fueron incubados en PBS/BSA durante 30 min, posteriormente se les adicionó un cóctel de inhibidores de ATP: 10 mM de azida de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 1 mM de cianuro de sodio y se incubaron por una hora.^{128,129} Al final de la incubación, se lavaron las células y resuspendieron en PBS/BSA/ NaN_3 y una concentración 30 μM de DXR por 30 min. Al final los cultivos se lavaron con PBS y las células se rompieron mediante agitación. La DXR se disolvió con metanol-HCl 0.2 N (1:1). La fluorescencia emitida por la DXR retenida fue determinada a una excitación a 427 nm, y emisión de 580 nm.

VIII.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores correspondientes a las concentraciones intracelulares de doxorubicina obtenidos en distintas condiciones experimentales entre los cultivos en monocapa o como microesférulas fueron analizados con una prueba de *t* pareada, con el programa Sigma Plot 8.0.

IX. RESULTADOS

Las células INER-51 al crecerse como microesférulas forman agregados celulares homogéneos de forma redondeada, manteniendo las células una morfología redondeada. Una de las características que se pueden recalcar de este tipo de cultivo es la formación de matriz extracelular, lo cual favorece y fortalece la estructura de la microesférula.

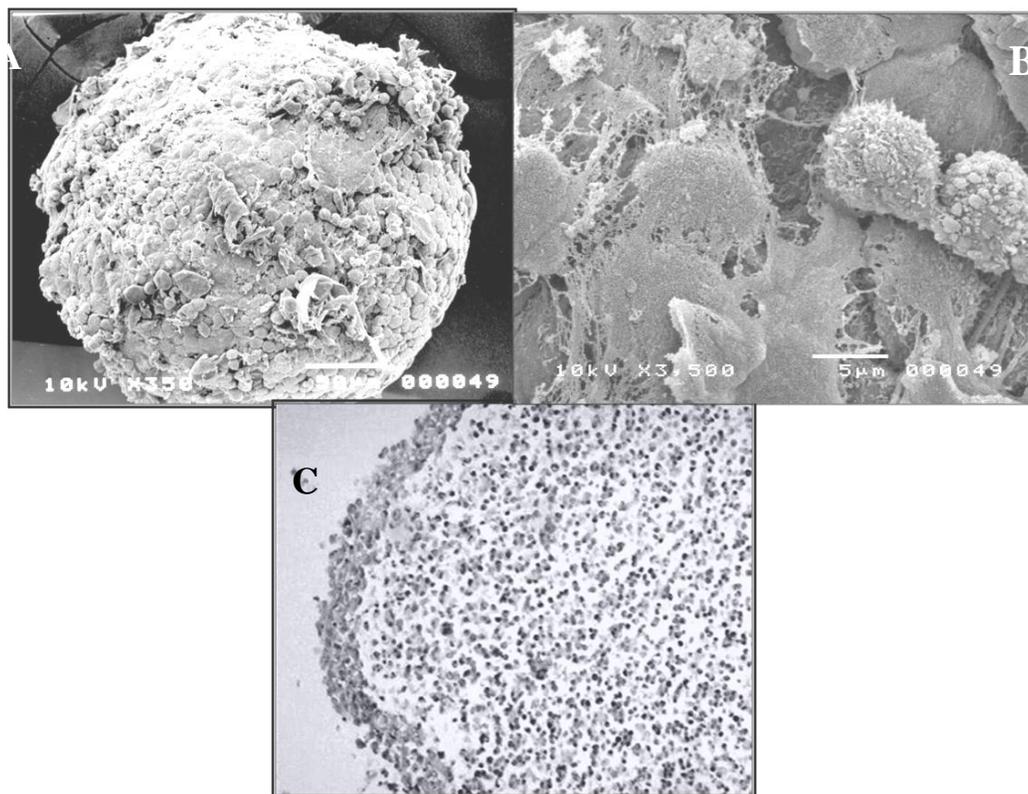


Figura 10. Caracterización de la línea celular INER-51 en cultivos de microesférulas. **A)** Microscopía electrónica de la microesférula, que contiene 5×10^3 células. **B)** Amplificación local de la microesférula donde se observan la morfología redondeada de las células, la presencia de microvellosidades y la formación de matriz extracelular. **C)** Corte histológico y tinción con hematoxilina eosina de las microesférulas de INER-51, donde se observa un anillo visible en la periferia de la microesférula.

IX.1 RETENCIÓN DE DOXORRUBICINA EN CULTIVOS DE MICROESFÉRULAS.

El primer mecanismo relacionado con la resistencia a múltiples fármacos descrito en células de mamíferos fue glicoproteína-P, esta proteína es responsable del fenotipo de resistencia a fármacos en leucemias y linfomas, sin embargo, no se ha descrito su importancia en tumores de cáncer de pulmón. Debido a que la glicoproteína P tiene la capacidad de expulsar un amplio espectro de fármacos, se utilizó uno de los substratos con mayor afinidad, la doxorrubicina que es un antibiótico con actividad intercalante del DNA, utilizado en quimioterapia y que tiene la propiedad de fluorecer.

Los resultados mostraron que los cultivos de INER-51 (35×10^4 células/ pozo) en monocapa (2D) retenían por lo menos dos veces (1.6 unidades de fluorescencia de diferencia) más fármaco que el mismo número de células cultivadas como microesférulas (3D) (Figura 11).

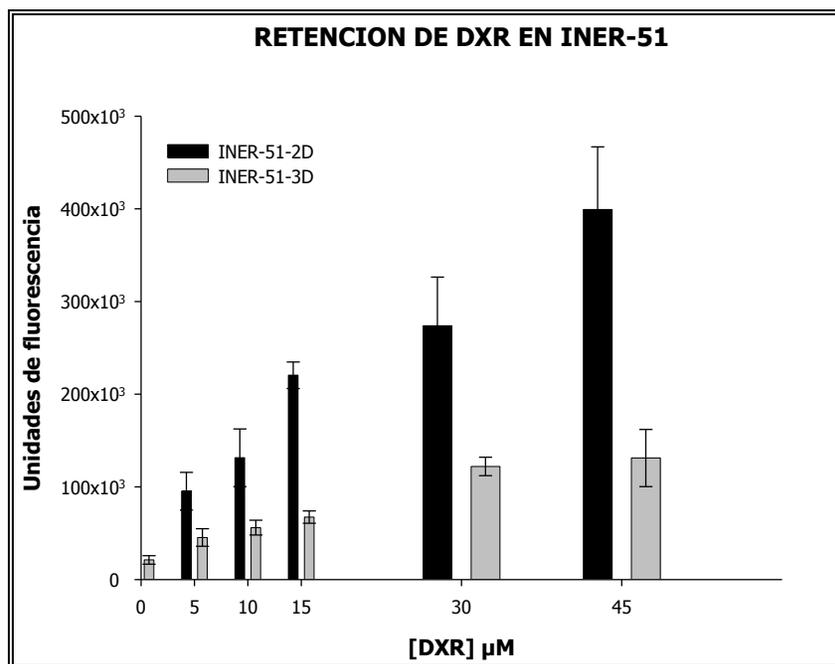


Figura 11. Ensayo de retención de DXR en cultivos de INER-51. Ensayo de fluorescencia realizado en células en cultivos de monocapa (2D)(■) y microesférulas (3D)(■).

IX.2. ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA-P EVALUADA POR LA EXPULSIÓN DE FÁRMACO (DXR).

Con el propósito de determinar si un mecanismo de expulsión más eficiente permite que las microesférulas presenten una concentración intracelular menor del fármaco, se analizó la expulsión de DXR en ambos tipos de cultivo (monocapas vs microesférulas). De esta manera, en ensayos de expulsión en células cargadas de DXR (30 μ M) por 30 min, se observó una rápida expulsión del fármaco en células en monocapa, donde se observa la pérdida de la mitad del fármaco desde los primeros 5 minutos (*Figura 12*). En el caso de las microesférulas los valores de DXR expulsada fueron mínimos, ya que desde el principio las microesférulas captaron poco fármaco (*Figura 12*). Estos resultados sugieren que en cultivo de microesférulas, existe un mecanismo que mantiene baja la concentración intracelular de DXR, y la expulsión de este fármaco se ve disminuida ya que probablemente se encuentre secuestrado en algún compartimento intracelular o unido a otra molécula.

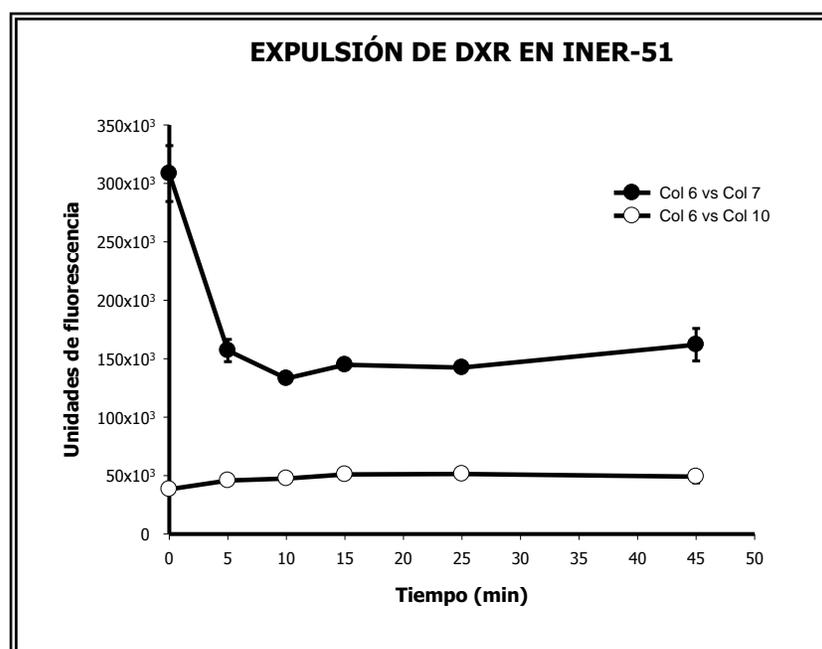


Figura 12. Ensayo de expulsión de DXR. Cultivos de células INER-51 en monocapas (●) y como microesférulas (○) tratadas con DXR (30 μ M) por 30 min a 4°C. Posteriormente se incubaron a 37°C en medio RPMI sin fármaco. La concentración interna de DXR a diferentes intervalos de tiempo fue analizada posteriormente por cuantificación de la fluorescencia del fármaco.

Estos experimentos se realizaron con el propósito de investigar si el incremento en la resistencia a DXR de los cultivos en microesférulas de INER-51 estaban determinados a una mayor capacidad de expulsión del fármaco que la determinada en cultivos de monocapa. La figura 10 muestra que los cultivos en monocapa eliminaron $\leq 50\%$ del fármaco en los primeros 5 min mientras que los cultivos en microesférulas no mostraron cambios significativos. Sin embargo, debe enfatizarse que la captación de DXR por los dos tipos de cultivo fue diferente.

IX.3. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P.

Para tratar de incrementar la captación intracelular de DXR en las microesférulas y con la idea de que gp-P era la responsable del fenómeno se utilizaron distintos inhibidores de gp-P: verapamil, ciclosporina-A y valsopodar (PSC833) (*Figura 13 a, b y c*). Los resultados mostraron que ciclosporina-A (Cs-A) fue el mejor inhibidor de la actividad de gp-P en cultivos de monocapa de INER-51 (*Figura 13b*). No obstante, cuando los experimentos de inhibición fueron realizados sobre cultivos de microesférulas, no parece encontrarse una inhibición de gp-P con ninguno de los fármacos empleados (*Figura 13 a, b y c*).

IX.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P MEDIANTE RETENCIÓN DE RHODAMINA 123 EN CULTIVOS DE MICROESFÉRULAS.

Para reforzar los resultados anteriores se uso un sustrato de gp-P distinto, la rhodamina 123. En la *Figura 14* se muestra que las diferencias entre los dos tipos de cultivo no estaban determinadas por el sustrato sino por la organización celular, es decir que en cultivos de monocapa las células INER-51 aún retienen mayor concentración de fármaco, en comparación con las mismas células cultivadas en estructuras de microesférula, las cuales retienen menos fármaco, lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente con el sustrato de DXR (*Figura 11*).

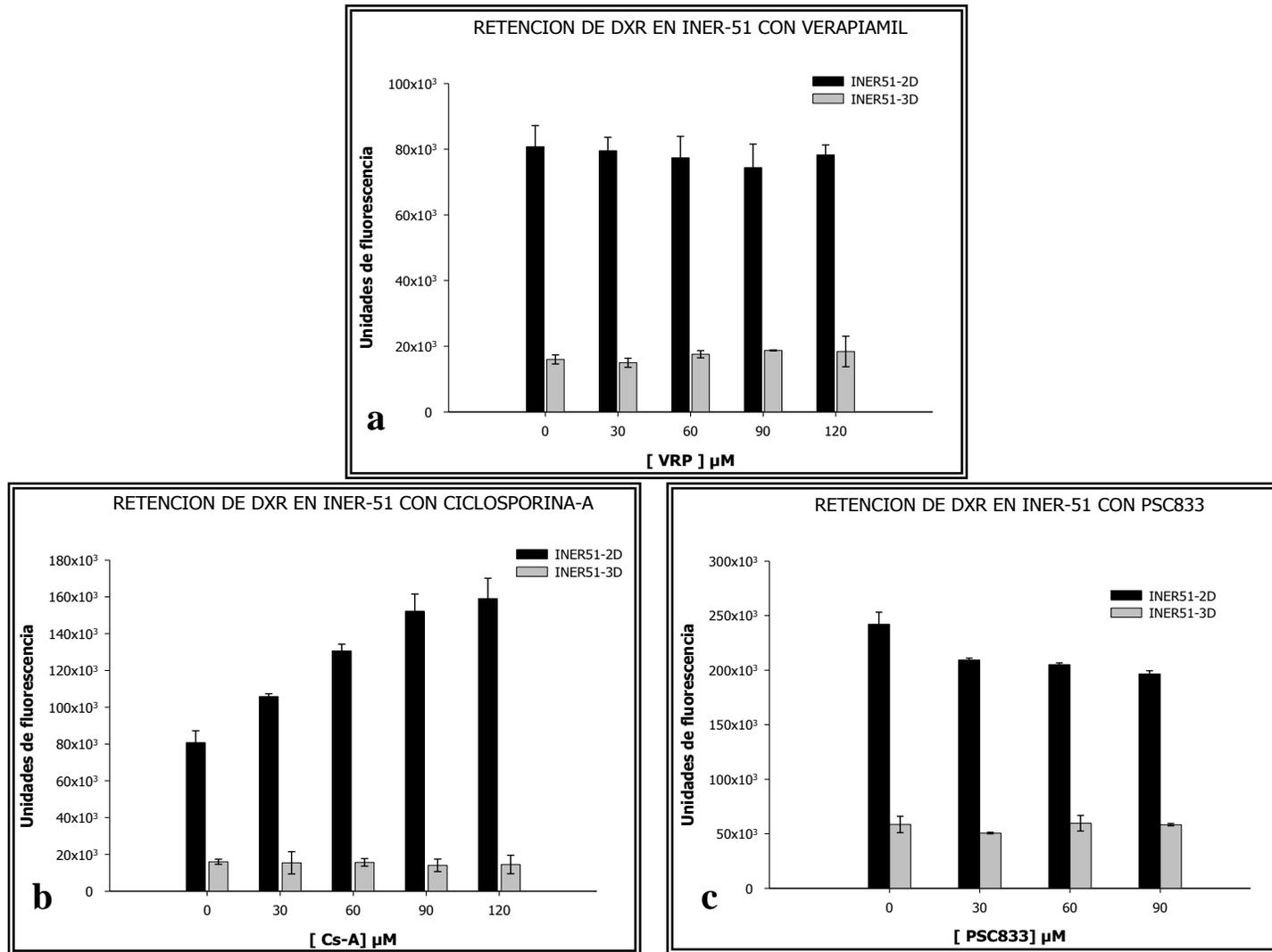


Figura 13. Efecto de agentes inhibidores de la actividad de gp-P. Fluorescencia obtenida después de una incubación de 30 min con DXR en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores como verapamil (a), ciclosporina-A (b) y PSC833/ valsopodar (c).

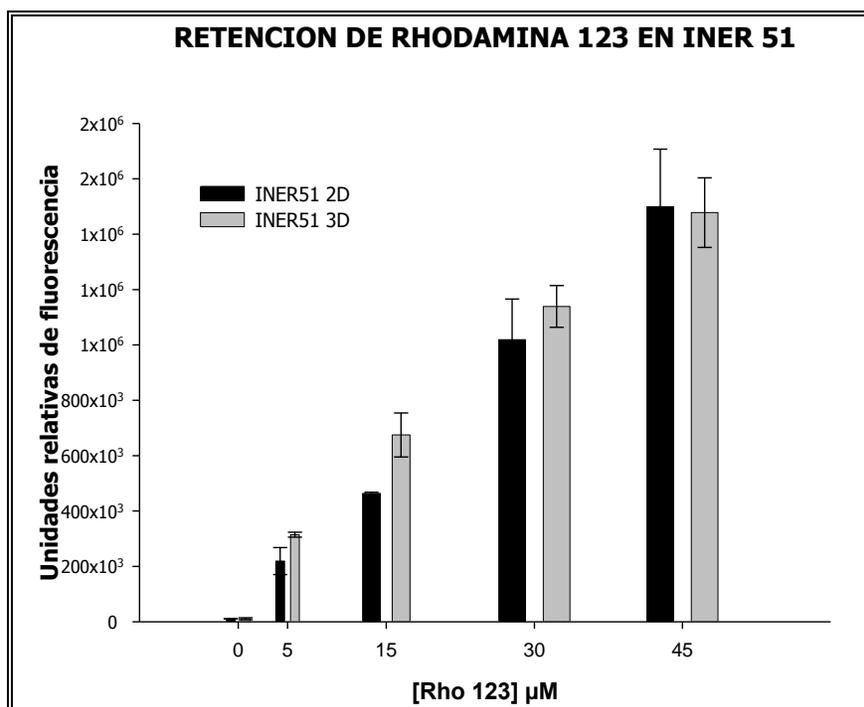


Figura 14. Retención de Rhodamina 123 (Rho) en cultivos de monocapa (2D) y microesférulas (3D) de la línea celular I-51.

IX.5. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P POR AUSENCIA DE ATP.

Los resultados indican que existe un mecanismo activo que puede sacar el fármaco del interior de las células y que su actividad no se veía afectada por los inhibidores clásicos de gp-P. Por esto se realizaron ensayos de inhibición de los niveles de ATP para confirmar esta hipótesis.

La inhibición de la actividad de gp-P al disminuir la concentración de ATP con 10 mM de azida de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 1 mM de cianuro de sodio, reveló que solo los cultivos en monocapa retienen DXR sin que hubiera ningún cambio en los cultivos de microesférulas de INER-51. (Figura 15)

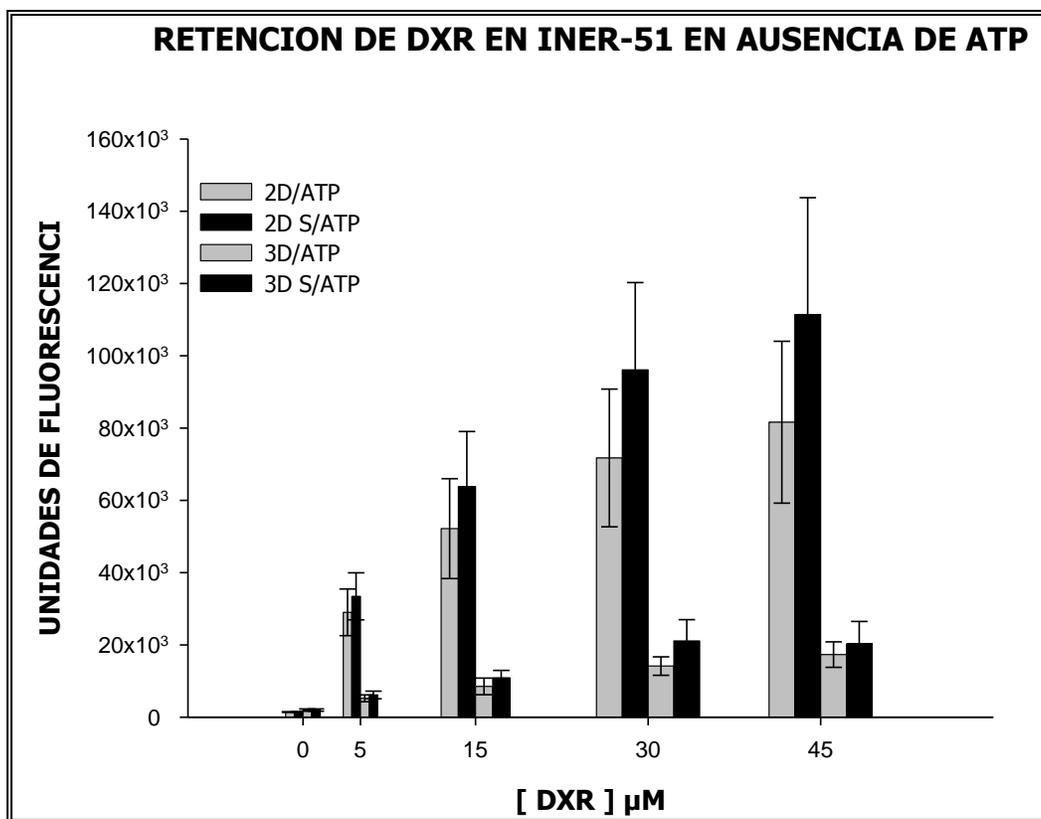


Figura 15. Actividad de glicoproteína-P en ausencia de ATP. Al inhibir la producción de ATP dentro de las células mediante venenos metabólicos (10 mM de azida de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 1 mM de cianuro de sodio), se observó la actividad de glicoproteína-P al realizar mediciones de la retención de doxorubicina (DXR) en cultivos de monocapa (2D) y microesférulas (3D) en la línea celular INER-51.

IX.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE ATP, EL CUAL ESTÁ RELACIONADO CON LA EXPULSIÓN DE FÁRMACOS.

Los datos anteriores hacen pensar que al cultivar a las células como microesférulas, existe un mecanismo dependiente de ATP, que no es inhibido por la actividad de verapamil, ciclosporina-A y PSC833 (valsopodar). El fenotipo de la célula INER-51 indica que no expresa el gen MRP1 (“*multidrug resistance related protein*”) lo cual llevó a pensar que podría existir otra proteína con actividad de expulsión de fármacos.

La proteína BCRP (siglas en ingles de su nombre “*Breast Cancer Resistance Protein*”) es otro miembro de los transportadores ABC que también tiene actividad de bomba de expulsión y para la cual DXR es un buen sustrato. Los resultados obtenidos hasta el momento hacían pensar que BCRP podría ser el mecanismo responsable de la resistencia a fármacos en cultivos de microesférulas en INER-51. (Figura 16)

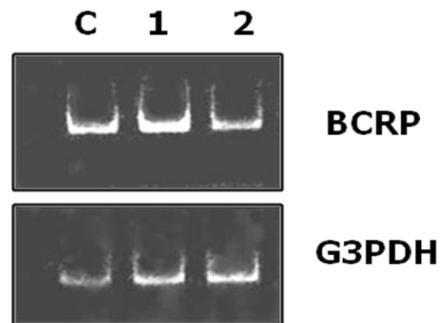


Figura 16. Expresión del transcrito de BCRP en la línea celular INER-51. Expresión del transcrito de BCRP (220pb) y G3PDH (110pb) en placenta (C, control) y en cultivos de INER-51 en monocapa (1) y microesférulas (2).

Por ensayos de RT-PCR se observó que en INER-51 se expresaba BCRP, sin embargo la expresión de este gen se daba tanto en cultivos de monocapa como de microesférulas, por lo cual BCRP no parecía ser el responsable de la resistencia multicelular (3D).

IX.7. ¿LA AUSENCIA DE GLICOPROTEÍNA-P INFLUYE EN EL FENOTIPO DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS EN CULTIVOS DE MICROESFÉRULAS?

a) OBTENCIÓN DE UNA CLONA CON FENOTIPO *gp-P^{neg}*

Debido a que hasta este momento no había sido posible comprobar que gp-P fuera directamente responsable de la expulsión de DXR, y de una mayor resistencia a fármacos, se decidió evaluar el mecanismo de resistencia a fármacos en ausencia de gp-

P. Para este fin, se realizaron cultivos de la línea celular INER-51 y mediante una coselección negativa con fármacos, se obtuvo una clona celular denominada PSC-1. Al ser analizada por medio de la técnica de RT-PCR, la clona PSC-1 no mostró expresión del gen MDR-1 (gen que codifica para la glicoproteína-P) y dicha clona fue denominada como I-51/PSC (gp-P^{neg}) [Figura 17: A) y B)]. Al comparar varios de los genes relacionados con la resistencia a múltiples fármacos, entre INER-51 e I-51/PSC no se mostró ningún cambio. Ambas líneas celulares expresaron topoisomerasas I, II α y II β , pero no expresaron MRP1 y GST- μ (Figura 18). Este análisis sugirió que I-51/PSC no presentaba diferencias evidentes en los genes de multirresistencia en comparación con la línea parental (INER-51), lo que dio la posibilidad de estudiar la resistencia multicelular en ausencia de gp-P.

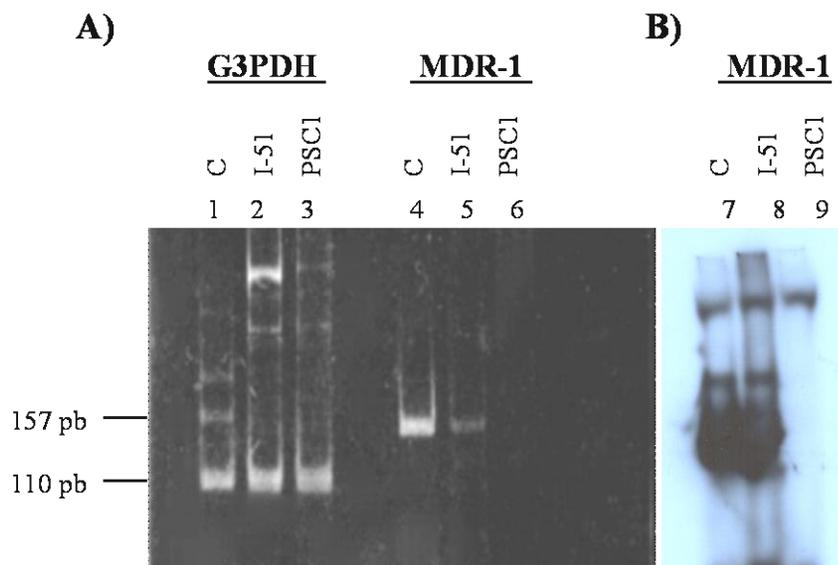


Figura 17 Análisis de la expresión de MDR-1 en las células INER-51 y la clona I-51/PSC. En la sección **A**), los carriles 1 y 4 corresponden a los productos de la línea celular A498 que fue utilizada como control de la expresión de MDR-1. Los carriles 2 y 5 con amplificaciones de I-51; y los carriles 3 y 6 corresponden a las amplificaciones de I-51/PSC. Se presenta la expresión del gen constitutivo G3PDH (110 pb) y la expresión del gen MDR-1 que codifica para la glicoproteína-P (157 pb). En la sección **B**) se representa una fotografía de la autorradiografía de la amplificación de MDR-1 utilizando ³²P-ATP.(carril 7 corresponde al control, carril 8 a la línea celular I-51 y carril 9 a la clona I-51/PSC).

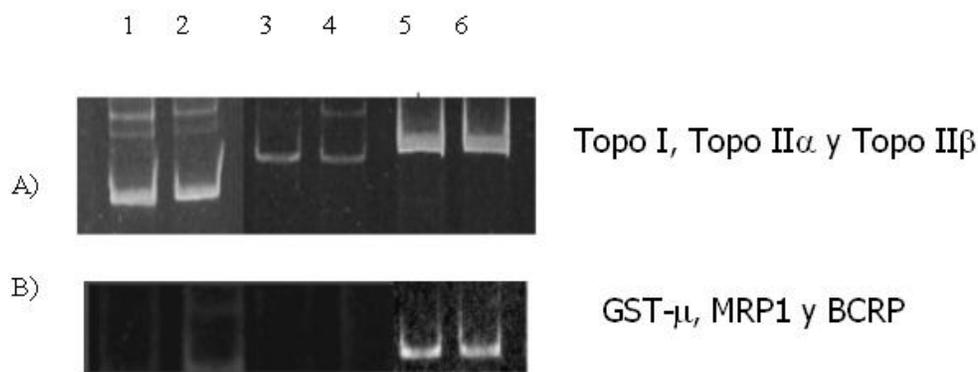


Figura 18. Expresión de los transcritos de los genes relacionados con la resistencia a múltiples fármacos en la línea celular INER-51 y su clona I-51/PSC. **A)** Amplificación para Topoisomerasa I, Topoisomerasa II α y Topoisomerasa II β , en las líneas celulares INER-51 (1, 3 y 5) y su clona I-51/PSC (2, 4 y 6). **B)** Amplificación del gen GST- μ , MRP1 y BCRP en ambas líneas celulares no hay expresión del transcrito.

IX.8. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD PARA LA CLONA I-51/PSC ($gp-P^{neg}$)

Con esta nueva línea celular, I-51/PSC, (con fenotipo $gp-P^{neg}$), se procedió a realizar experimentos de citotoxicidad con DXR en células I-51/PSC, crecidas en monocapa o microesférulas. Los resultados mostraron que I-51/PSC en cultivos de microesférulas continuaba manteniendo el fenotipo de resistencia a fármacos, en valores muy semejantes a las microesférulas de la línea parental (INER-51).(*Figura 19*)

IX.9. RETENCIÓN DE FÁRMACOS EN CULTIVOS DE MONOCAPA Y MICROESFÉRULAS EN LA CLONA I-51/PSC

La clona I-51/PSC presentó un comportamiento similar al de su línea parental INER-51 al realizar ensayos de retención de diferentes fármacos (DXR y Rho123) para comparar su actividad (*Figura 20*). Los resultados mostraron que en cultivos de monocapa, las células de I-51/PSC retienen más fármaco que las mismas células cultivadas en estructuras de microesférulas, lo cual se relaciona de manera directa con lo observado anteriormente con su parental I-51, lo cual indica que existe otro mecanismos diferente de glicoproteína-P que se encarga no solo de la citotoxicidad celular sino también que está relacionado con los cambios en la concentración interna del fármaco en los diferentes tipos de cultivo.

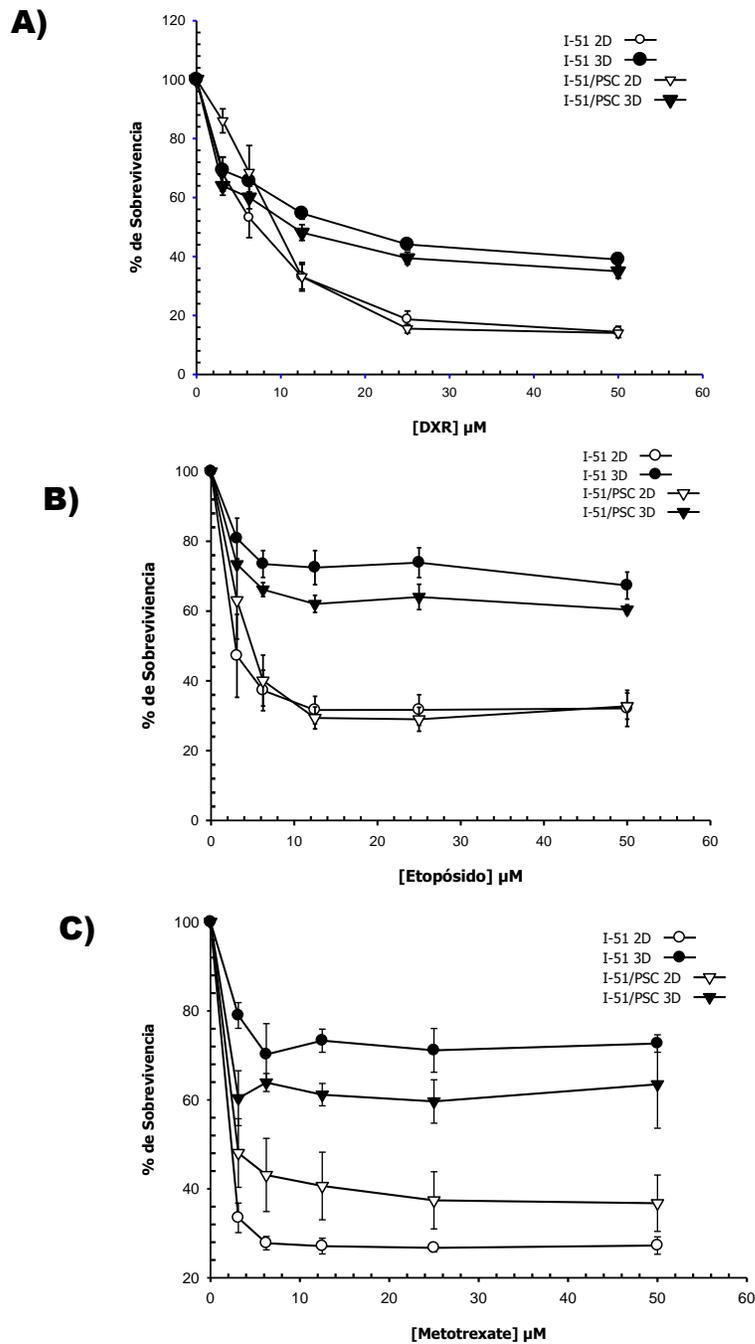


Figura 19. Efecto citotóxico de DXR (A), etopósido (B), metotrexate (C) en la línea celular INER-51 (I-51 \circ) y su clona (I-51/PSC ∇), la cual presenta un fenotipo gp-P (negativo). Los ensayos fueron realizados en cultivos de monocapa (\circ y ∇) y en cultivos de microesférulas (\bullet y \blacktriangledown), de ambas líneas celulares. Mediante análisis estadístico se comprobó que no había diferencias significativas entre el comportamiento de la línea parental (I-51) y la clona seleccionada (I-51/PSC)

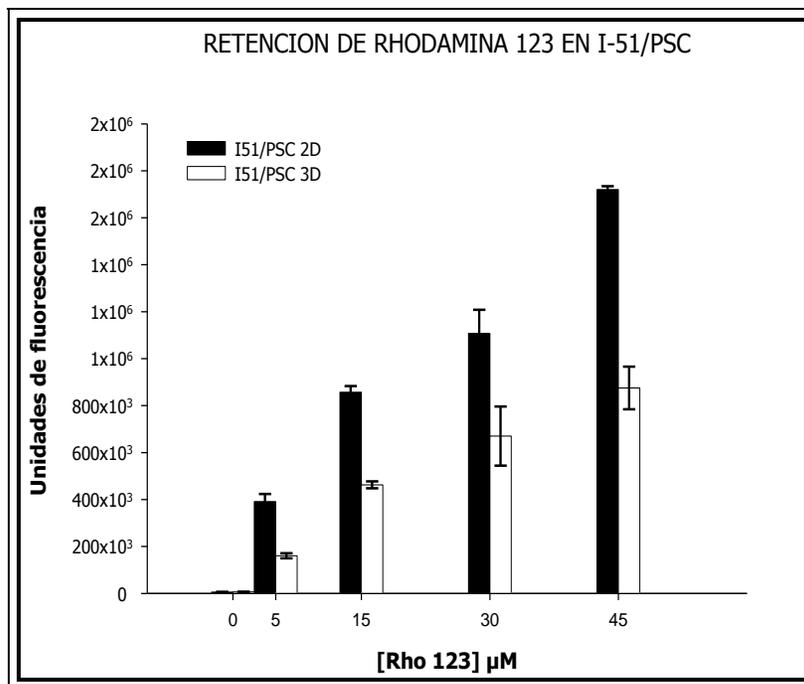
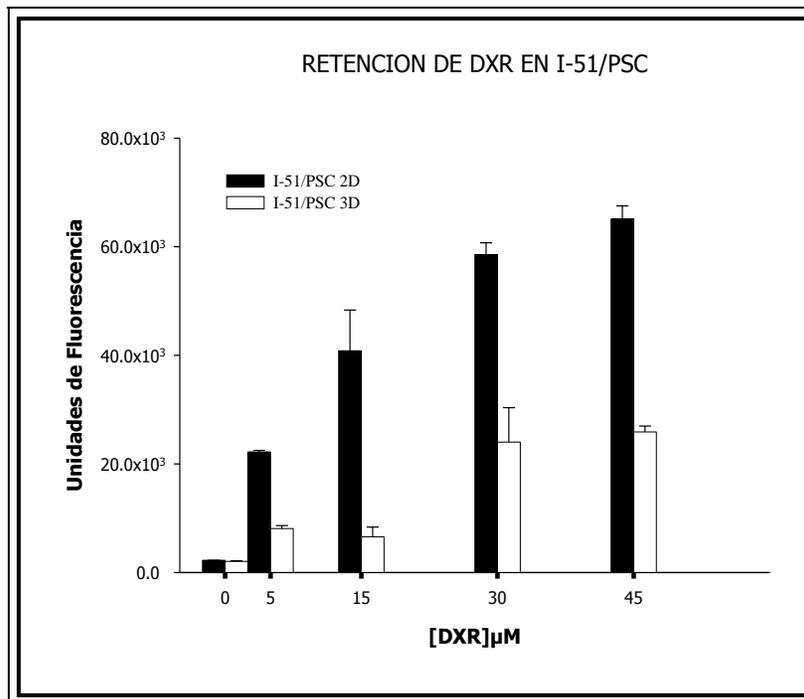


Figura 20 Retención de fármacos en cultivos de monocapa (2D) y microesférulas (3D) de la línea celular I-51/PSC. **a)** Ensayo de retención de doxorubicina (DXR) en cultivos de I-51/PSC. **b)** Ensayo de retención de Rhodamina123 (Rho123) en cultivos de I-51/PSC.

X. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y el cáncer de pulmón uno de los principales tipos.⁴ Existen 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 utilizados en quimioterapia. Sin embargo, la mayoría de los modelos utilizados hasta la fecha han sido realizados en cultivos de monocapas de células tumorales, por lo que muchas veces los resultados obtenidos son difíciles de extrapolar a los fenómenos *in vivo* observados en clínica. Así, resulta de gran importancia desarrollar modelos que se acerquen a las condiciones reales de crecimiento de los tumores sólidos, siendo uno de estos modelos el crecimiento de células en cultivo de microesférula.^{108,112}

Las células tumorales mantienen múltiples características del tejido del cual se originaron, dichas características también pueden observarse en el tumor; Weaver y cols.¹³⁰ realizaron cultivos 3D con células de cáncer de mama de origen epitelial y encontraron la formación de estructuras glandulares, por lo cual al realizar cultivos en microesférulas de células tumorales se puede dar un acercamiento al comportamiento de las células en un arreglo similar al tejido tumoral, y con este modelo se puede estudiar cual es la respuesta de las células tumorales al ser tratadas con fármacos de quimioterapia.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que las dos líneas celulares de cáncer de pulmón que fueron evaluadas (INER-37 e INER-51), presentaron patrones de citotoxicidad muy semejantes, ya que al ser cultivadas como microesférulas la resistencia a fármacos se incrementó más de 500 veces en el IC₅₀ en comparación con las mismas células cultivadas en monocapas, lo cual indicaba que ambas líneas celulares compartían un mecanismo que les confería el fenotipo de resistencia a fármacos.¹¹⁹⁻¹³¹

En tumores sólidos, una explicación frecuente para el bajo o nulo efecto de la quimioterapia lo constituye el tamaño del tumor, en tumores de más de 1 cm de diámetro, la posibilidad de que el fármaco llegue a las capas más internas es baja y su actividad está en relación directa con el tamaño del tumor;^{107,132,133} otro de los factores que afectan la respuesta al tratamiento son la falta de nutrientes, hipoxia y apoptosis en zonas

periféricas.¹³⁴ En estudios *in vitro*, una posibilidad para explicar el aumento en la resistencia hacia los fármacos lo constituye el número de células que formaron las microesférulas, así como la compactación entre ellas. Sin embargo, esta posibilidad fue descartada en este proyecto ya que las microesférulas utilizadas no tenían un tamaño mayor a 5 mm (de 300 μ M a 2mm dependiendo del número de células) y se evaluó la penetración de sustancias como MTT, fármacos fluorescentes y cortisol (datos no mostrados). En nuestros cultivos no se presentaban problemas de hipoxia, falta de nutrientes y apoptosis central en las microesférulas como se ha reportado en otros trabajos.^{135,136}

El incremento en la expresión de MDR1 ha sido detectado en líneas celulares con fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Experimentos donde se transfectaba el gen de MDR1 demostraron que la expresión de este gen es suficiente para que se presente la resistencia a fármacos. Sin embargo el fenotipo de multiresistencia o resistencia cruzada no suele presentarse en células sin previo tratamiento, generalmente las células seleccionadas con diferentes fármacos *in vitro* presentan una resistencia preferencial al fármaco con el cual fue seleccionada. Nosotros obtuvimos una línea celular con fenotipo de multiresistencia a fármacos de un paciente sin tratamiento a quimioterapia y este fenotipo se mantenía de igual forma en cultivos de microesférulas, por otro lado al crecer las células INER-51 como microesférulas no se observó un aumento en el transcrito.

Debido a que la captación de fármaco es un proceso dinámico de entrada (difusión simple) y salida (expulsión por mecanismo activo o difusión) y se ha considerado a la glicoproteína-P como el principal mecanismo de la resistencia a múltiples fármacos se procedió a determinar si la actividad de gp-P se encontraba aumentada en cultivos de microesférulas, ya que al realizar los ensayos de retención de fármaco (DXR) se observó que en cultivos de microesférulas había menor concentración de fármaco en las microesférulas que en las células de monocapa, y al analizar la expulsión del fármaco se observó que en cultivos de monocapa esta ocurría rápidamente, evidenciando la presencia de un transporte activo. Estos resultados se relacionan con los resultados obtenidos por Tunggal, et al ¹³⁷ donde se observa una lenta y limitada penetración para algunos fármacos (DXR y mitoxantrona), y una mejor distribución de fármacos como (5FU) en cultivos

multicelulares de células de cáncer de mama. En el caso de las microesférulas de INER-51 se observó una baja captación de fármaco (DXR), sin embargo, la disminución en la captación de DXR no se debió a una alteración en la difusión del fármaco ya que se utilizó ³H-cortisol como control de permeabilidad, mostrando los mismos valores de captación sin importar el tipo de cultivo.(datos no mostrados).

Estos resultados sugerían que en las microesférulas de INER-51 estaba presente un mecanismo de transporte activo que mantenía bajos los niveles de DXR en las células tumorales, estudios previos (Durand, et al y Martin, et al)^{138,139} sugieren que la función de gp-P en las células que están en contacto en las microesférulas, puede permitir no solo que se exporte el fármaco al espacio extracelular sino también la transferencia del fármaco entre las células. Con la finalidad de incrementar los niveles de DXR en las células de microesférulas se utilizaron diferentes moduladores de la actividad de gp-P [Cs-A, VRP y PSC833 (valsopodar)]. Sin embargo, el único inhibidor de la actividad de gp-P que tuvo efecto fue Cs-A en cultivos de monocapa pero no en cultivos de microesférulas. Esto se puede explicar porque en estudios previos¹⁴⁰⁻¹⁴² se ha demostrado que algunas mutaciones del gen de la gp-P (MDR-1) y que afectan los aminoácidos en la proteína dan como resultado alteraciones en los patrones de la actividad de los inhibidores, por lo cual se propone estudiar a mayor detalle el fenotipo de gp-P en esta célula.

Evidencias recientes muestran que la gp-P puede asociarse con proteínas intracelulares tales como proteínas de citoesqueleto o proteínas de estrés (HSP90) las cuales pueden modificar la gp-P, desde la estabilidad de la proteína hasta su conformación, dando como resultado cambios en su actividad y respuesta hacia ciertos fármacos. De esta manera, es posible que la falta de inhibición de Cs-A en gp-P pudiera deberse a un bloqueo estérico en el sitio de unión del fármaco.¹⁴²⁻¹⁴⁶

Con la finalidad de obtener una visión clara sobre la importancia de la actividad de gp-P como mecanismo de resistencia a múltiples fármacos en células cultivadas como microesférulas, y bajo la premisa de que la función de gp-P se puede ver alterada por mutaciones¹⁴⁷, por inhibidores de la actividad, o por inhibición de la expresión de dicha proteína^{148,149} dando como resultado una sensibilidad incrementada a fármacos utilizados en

quimioterapia; se realizó una coselección negativa para modificar la actividad de la gp-P, de la cual se obtuvo una clona con fenotipo gp-P^{neg} (I-51/PSC), esta clona de INER-51, aún en ausencia de gp-P mantenía su fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, tanto en cultivos de monocapa como en microesférulas. En células donde no se expresa o se ha inhibido la expresión de gp-P ha observado un aumento en la expresión de otros mecanismos de resistencia, tales como BCRP, MRP1 o LRP^{88,150-152}, al caracterizar nuestra clona I-51/PSC(gp-P^{neg}) mediante ensayos de RT-PCR para la expresión del transcrito de genes relacionados con la resistencia a múltiples fármacos, se observó que la clona I-51/PSC no expresaba el mRNA de las proteínas de membrana gp-P, MRP1, ni su proteína asociada GST-μ, y tampoco presentaba cambios en la expresión de los transcritos de topoisomerasas I y II, al ser cultivadas en monocapas o microesférulas. Sin embargo al evaluar la expresión BCRP se observó que había una disminución en la expresión del transcrito en I-51/PSC al ser comparada con su parental INER-51; estos resultados son opuestos a lo observado por Scheper⁸⁸ donde las células que no expresaban gp-P sobre expresaban BCRP. Al evaluar el fenotipo de resistencia mediante ensayos de citotoxicidad con diferentes fármacos de quimioterapia no relacionados, se observó que la clona con fenotipo gp-P^{neg} (I-51/PSC) mantenía el fenotipo de resistencia observado en la célula parental INER-51. Estos resultados se relacionan con lo observado por Rolff, donde la expresión de otros mecanismos de resistencia no parece estar relacionada con la respuesta de las células hacia la exposición del fármaco en células de NSCLC.¹⁵³

En un principio se pensó que dicha resistencia podría estar relacionada con la expresión de la proteína de membrana BCRP, la cual transporta un amplio espectro de fármacos al igual que glicoproteína-P (DXR, rhodamina, etc), sin embargo hasta la fecha no se ha demostrado que la eficiencia de la proteína sea tal como para alcanzar los niveles obtenidos en estos experimentos. Hasta ahora no se ha demostrado que esta proteína (BCRP) pueda transportar etopósidos (VP-16) o metotrexato (MTX), lo cual no explicaría por qué la clona seleccionada I-51/PSC presenta el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. La baja actividad de BCRP observada en nuestros experimentos puede estar relacionada, con las observaciones realizadas por Shukla¹⁵⁴, en donde se ha visto la relación que existe entre gp-P y BCRP. Estudios realizados con diferentes inhibidores permitieron

observar, que cuando disminuye la expresión de gp-P también se ve disminuida la expresión de BCRP, lo cual concuerda con nuestros resultados ya que observamos disminución en la expresión de transcrito de BCRP en la clona gp-P^{neg} (I-51/PSC). Por lo cual se propone realizar un estudio más detallado para evaluar la actividad de BCRP en éstas líneas celulares, utilizando ambos tipos de cultivo (monocapa y microesférulas)

La gp-P pertenece a una superfamilia de transportadores con unión de ATP (transportadores ABC), que funcionan en forma activa en el transporte de un amplio espectro de sustancias a través de la membrana. Hasta la fecha se han identificado más de 100 miembros de esta familia en humanos y varios de ellos han sido asociados con la resistencia a fármacos en líneas celulares tumorales, sin embargo, el espectro de resistencia no es tan grande como el que confiere gp-P. El hecho de que múltiples transportadores puedan acarrear a varios agentes anti-tumorales tiene importantes implicaciones en el desarrollo y estudio de fármacos. Los antraciclanos (DXR) por ejemplo, son sustratos de gp-P, MRP-1 y BCRP, por lo que células que expresen más de una de estas proteínas tendrán mayor oportunidad de resistir la acción citotóxica del fármaco. Por otro lado los inhibidores de la actividad de dichos transportadores son específicos para cada proteína, por lo cual la inhibición de un transportador no podría impedir la función de algún otro. Este tipo de observaciones concuerda con nuestros resultados y con la acentuada resistencia a fármacos encontrada en clínica, pudiendo explicar el porqué muchos de los ensayos clínicos con agentes quimiosensibilizadores no han tenido resultados favorables.¹⁵⁰⁻¹⁵⁶

En la actualidad se han desarrollado nuevos fármacos que inhiben la actividad de varias proteínas transportadoras a la vez, tales como la tetrahidrocurcumina¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Sin embargo cabe recalcar que estos estudios han sido realizados con células derivadas de cáncer de mama, cérvix y clonas seleccionadas para un fenotipo de resistencia. El desarrollo de nuevos compuestos que tengan la capacidad de inhibir a más de una proteína transportadora será una de las metas más importantes en tratamiento de quimioterapia. La actividad de dichos compuestos deberá ser evaluada con diferentes líneas celulares de origen distinto, así como en estructuras de microesférulas para ver si su función inhibitoria se mantiene y tiene una respuesta satisfactoria en el tratamiento de los tumores.

Finalmente, tomando en cuenta que: **1)** La línea celular INER-51 presenta un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y expresa la glicoproteína-P (gp-P); **2)** Al realizar una co-selección negativa, con fármacos, se elimina la expresión del gen MDR-1 que codifica para glicoproteína-P se obtiene una clona gp-P^{neg} (I-51/PSC) y **3)** la clona I-51/PSC con fenotipo gp-P^{neg} mantiene un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos al ser cultivada tanto en monocapas como en microesférulas, concluimos que la glicoproteína-P no tiene un papel fundamental en la resistencia a fármacos utilizados en quimioterapia (DXR, VP-16 y MTX) en las líneas celulares INER-51 e I-51/PSC de cáncer de pulmón crecidas en modelo de microesférula.

XI. CONCLUSIÓN

En conjunto, estas evidencias hacen suponer que no existe un mecanismo único de resistencia, responsable de la resistencia a múltiples fármacos y que dicha resistencia sea resultado de una serie de mecanismos conjuntos que actúan a diferentes niveles celulares y con diferentes estrategias que convergen en un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Por lo cual es importante tener en cuenta que en tumores sólidos pueden existir otros mecanismos relacionados con la resistencia a fármacos que hasta la fecha no han sido considerados en cultivos de monocapas, por lo cual, se debe profundizar en la importancia de proteínas de matriz, proteínas de citoesqueleto y proteínas de estrés, las cuales pueden tener un fuerte impacto en la respuesta de los tumores sólidos hacia la actividad de los fármacos antitumorales utilizados en quimioterapia.

XII. REFERENCIAS

1. Bast R, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF and E Frei. *Cancer Medicine*. 5ed. American Cancer Society Hamilton. London. (2000)
2. Macdonald F, Ford CHJ and AG Casson. *Molecular Biology of Cancer*. 2ªed. Garland Science/BIOS Scientific Publishers. London. (2004)
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and P Pisani. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94: 153-156 (2001)
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and P Pisani. *Global Cancer Statistics 2002*. *CA Cancer J Clin* 55:74-108 (2005)
5. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG and BK Edwards (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009)
6. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, López-Campos JL, Vigil E, and R Otero. Lung cancer mortality trends in Spain between 1980 and 2005. *Arch Bronconeumol* 44:70-74 (2008)
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J and MJ Thun. *Cancer Statistic 2009*. *CA Cancer J Clin* 56:106-130 (2009)
8. Peto R, Lopez AD, Boreham J, et al. *Mortality from smoking in developed countries: 1950-2000*. New York: Oxford University Press. (1994)
9. Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Meneses-González F, Rascón-Pacheco RA and M Hernández-Avila. Trends of lung cancer mortality in México. *Arch Med Res* 28:565-570 (1997)
10. Medina-Morales F y M Salazar-Flores. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. *Salud Pública Mex* 42:333-336 (2000)
11. Medina-Morales F, Salazar-Flores M, García-Sancho MC y MF Franco. Epidemiología descriptiva del cáncer pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México 1997-2000. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 15:149-152 (2002)
12. *Estadísticas demográficas 2006*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (INEGI) México. 216 pp (2008)
13. Franco-Marina F y J Villalba-Caloca. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 14:207-214 (2001)
14. Tovar-Guzmán VJ, Barquera S y FJ López-Antuñano. Tendencias de mortalidad por cánceres atribuibles al tabaco en México. *Salud Pública Mex* 44suppl 1:S20-S28 (2002)
15. *Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality*. American Lung Association Epidemiology and Statistics Unit. Research Program Services Division. September 2008 36pp.
16. Shapiro JA, Jacobs EJ and MJ Thun. Cigar smoking in men and risk of death from tobacco related cancers. *J Natl Cancer Inst* 92:333-337 (2000)

17. Samet JM, Avila-Tang E, Boffeta P, Hannan LM, Olivo-Marston S, Thun MJ and CM Rudin. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res* 15:5626-5645 (2009)
18. Alberg AJ, Ford JG and JM Samet. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* 132:29S-55S (2007)
19. Gazdar AF, Bader S, Hung J, Kishimoto Y, Sekido Y, Sugio K, Virmani A, Fleming J, Carbone DP and JD Minna. Molecular Genetic Changes Found in Human Lung Cancer and Its Precursor Lesions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* LIX:565-572 (1994)
20. Forgacs E, Zöchbauer-Müller, Oláh E and JD Minna. Molecular Genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathology Oncology Res* 7:6-13 (2001)
21. Dammann R, Li C, Ion JH, Chin PL, Bates S, and GP Pfeifer. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 2p21.3. *Nat Genet* 25:315-319 (2000)
22. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF and JD Minna. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 61:249-55 (2001)
23. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF and JD Minna. 5' CpG Island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 61:3581-3585 (2001)
24. Zöchbauer-Müller S, Minna JD and AF Gazdar. Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *The Oncologist* 7:451-457 (2002)
25. Vaporciyan AA, Nesbitt JC, Lee JS, Stevens C, Kimaki R and JA Roth. Cancer of the lung. In: *Cancer Medicine*. 5^a Ed. Edited by Bast R, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holand JF and E Frei. American Cancer Society Hamilton. London (2000)
26. Minna JD, Higgins GA and EJ Glatstein. En: *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Editado por: De Vita VT, Hellman S and SA Rosenberg. 11^aed USA. Págs: 507-588 (1993)
27. Brambilla E, Travis WP, Colby TV, Corrin B and Y Shimosato. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18:1059-1068 (2001)
28. Watanabe Y. TNM Classification for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 9:343-350 (2003)
29. Rivera Rosales RM y M Salazar Flores. Cáncer pulmonar: Distribución de metástasis de acuerdo al tipo histológicos. Estudio de autopsias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 15: 84-89 (2002)
30. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF and JD Minna. Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 58:892-900 (2003)
31. Spira A and DS Ettinger. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. *N Engl J* 350:379-92 (2004)
32. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL and RM Rudd. Initial evaluation of the patient with lung cancer. *CHEST* 123:97S-104S (2003)
33. Borczuk AC, Toonkel RL and CA Powell. Genomics of Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6:152-158 (2009)

34. Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, Negoro S, Sugiura T, Yokoyama A, Fukuoka M, Mori K, Watanabe K, Tamura T, Yamamoto S and N Saijo. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346:85-91 (2002).
35. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J and DH Johnson. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 346:92-98 (2002)
36. Hirsch FR, Varella-Garcia M and F Cappuzzo. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 28:S32-S37 (2009)
37. Kruh GD. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene* 22:7262-7264 (2003)
38. Goldie JH. Drug resistance in cancer: A perspective. *Cancer Metast Rev* 20:63-68 (2001)
39. Bosch I and J Croop. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1288:F37-F54 (1996)
40. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM and I Pastan. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3004-3008 (1987)
41. Litman T, Druley TE, Stein WD and SE Bates. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58:931-959 (2001)
42. Borst P, Evers R, Kool M and J Wijnholds. A family of drug transporters the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92:1295-1302 (2000)
43. Van Luyn MJ, Müller M, Renes J, Meijer C, Scheper RJ, Nienhuis EF, Mulder NH, Jansen PL and EG De Vries. Transport of Glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. *Int J Cancer* 76:55-62 (1998)
44. Dingemans AMC, va Ark-Otte J, van der Valk P, Apolinario RM, Scheper RJ, Postmus PE and G Giaccone. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann Oncology* 7:625-630 (1996)
45. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Ann Rev Med* 53:615-627 (2002)
46. Lai SL, Goldstein LJ, Gottesman MM, Pastan I, Tsai CM, Johnson BE, Mulshine JL, Ihde DC, Kayser K and AF Gazdar. MDR1 gene expression in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 81:1144-1150 (1989)
47. Doyle LA and DD Ross. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22:7340-7358 (2003)
48. Stavrovskaya AA and TP Stromskaya. Transport proteins of the ABC family and Multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 73:592-604 (2008)
49. Forterre P, Griblado S, Gadelle D and MC Serre. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 98:427-246 (2007)
50. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9:338-350 (2009)
51. Higgins CF. ABC transporters: From microorganisms to man. *Ann Rev Cell Biol* 8:67-113 (1992)

52. Dean M, Rzhetsky A and R Allikmets. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156-1166 (2001)
53. Gottesman MM, Fojo T and SE Bates. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev Cancer* 2:48-58 (2002)
54. Borst P and RO Elferink. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Ann Rev Biochem* 71:537-592 (2002)
55. Juliano LR and V Ling. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162 (1976)
56. Sharom FJ, Lugo MR and PD Eckord. New insights into the drug binding, transport, and lipid flippase activities of the P-glycoprotein multidrug transporter. *J Bioenerg Biomembr* 37:481-487 (2005)
57. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KL and GM Pollack. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 21:778-796 (2001)
58. Johnstone RW, Ruefli AA and MJ Smyth. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 25:1-6 (2000)
59. Hrycyna CA. Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance. *Cell Develop Biol* 12:247-256 (2001)
60. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna Z and MM Gottesman. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22:7468-7485 (2003)
61. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC transporters. *Oncogene* 22:7496-7511 (2003)
62. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and U Brinkmann. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 97:3473-3478 (2000)
63. Schwab M, Eichelbaum M and MF Fromm. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:285-307 (2003)
64. Wang D and W Sadee. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J* 8:E515-520 (2006)
65. Triller N, Korosec P, Kern I, Kosnik M and A Debeljak. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* 54:235-240 (2006)
66. Abe Y, Ohnishi Y, Yoshimura M, Ota E, Ozeki Y, Oshika Y, Tokunaga T, Yamazaki H, Ueyema Y, Ogata T, Tamaoki N and M Nakamura. P-glycoprotein mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo. *Br J Cancer* 74:1929-1934 (1996)
67. Chen GK, Lacayo NJ, Durán GE, Cohen D and BI Sikic. Loss of cyclosporin and azidopine binding are associated with altered ATPase activity by a mutant P-glycoprotein with deleted Phe335. *Mol Pharmacol* 57:769-777 (2000)
68. Uchiyama-Kokub N, Watanabe T and D Cohen. Intracellular levels of two cyclosporin derivatives valspodar (PSC833) and cyclosporin A closely associated with multidrug

- resistance-modulating activity in sublines of human colorectal adenocarcinoma HCT-15. *Jpn J Cancer Res* 92:1116-1126 (2001)
69. Fojo T and SE Bates. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* 22:7512-7523 (2003)
 70. Modok S, Mellor HR and R Callaghan. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 6:350-354 (2006)
 71. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV and RG Deeley. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650-1654 (1992)
 72. Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SPC and RG Deeley. Characterization of the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. *Cancer Res* 55:102-110 (1995)
 73. Kruh GD and MG Belinsky. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22:7537-7552 (2003)
 74. Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SPC, Deeley RG and JH Gerlach. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res* 5:673-680 (1999)
 75. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG and Y Li. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem* 15:1981-2039 (2008)
 76. Laupeze B, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Branger B, Grosset JM, Lamy T, Fauchet R and O Fardel. High multidrug resistance protein activity in acute myeloid leukaemias is associated with poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematology* 116:834-838 (2002)
 77. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte I, Pijnenborg ACLM, Schinkel AH, van de Vijver MJ, Scheper RJ and HM Schellens. Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Res* 61:3458-3464 (2001)
 78. Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y and Y Sugimoto. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther* 1:611-616 (2002)
 79. Sugimoto Y, Tsukahara S, Ishikawa E and J Mitsuhashi. Breast cancer resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Cancer Sci* 96:457-465 (2005)
 80. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S and AA Fryer. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation Res* 482:21-26 (2001)
 81. Townsend DM and KD Tew. The role of glutathione S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22:7369-7375 (2003)
 82. Moscow JA and KH Dixon. Glutathione-related enzymes, glutathione and multidrug resistance. *Cytotechnology* 12:155-170 (1993)
 83. Carlsten C, Sagoo GS, Frodsham AJ, Burke W and JPT Higgins. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and Lung Cancer: A literature based systematic HuGE review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 167:759-774 (2008)

84. O'Brien M, Kruh GD and KD Tew. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Therap (JPET)* 294:480-487 (2000)
85. Filomeni G, Turella P, Dupuis ML, Forini O, Ciriolo MR, Cianfriglia M, Pezzola S, Federici G and AM Caccuri. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1-mediated MDR in small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 7:371-379 (2008)
86. Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC and LH Rome. Vaults III, Vault ribonucleoprotein particles open into flower like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol* 112:225-235 (1991)
87. Bouhamyia L, Chantot-Bastaraud S, Zaid S, Roynard P, Prengel C, Bernaudin JF and J Fleury-Feith. Immunolocalization and cell expression of lung resistance-related protein (LRP) in normal and tumoral human respiratory cells. *J Histochem Cytochem* 55:773-782 (2007)
88. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, Van Heijningen THM, Van Kalken CK, Slovak ML, De Vries EGE, Van der Valk P, Meijer CJLM and HM Pinedo. Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 53:1475-1479 (1993)
89. Herlevsen M, Oxford G, Owens CR, Conaway M and D Theodorescu. Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. *Mol Cancer Ther* 6:1804-1813 (2007)
90. Lee E and SJ Lim. The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines. *Arch Pharm Res* 29:1018-1023 (2006)
91. Liu LF and KG Miller. Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3487-3491 (1981)
92. Liu Z, Deibler RW, Chan HS and L Zechiedrich. The why and how of DNA unlinking. *Nucleic Acid Research* 37:661-671 (2009)
93. Dewese JE and N Osheroff. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* 37:738-748 (2009)
94. D'Arpa P, Machlin PS, Rattie H III, Rothfield NF, Cleveland DW and WC Earnshaw. cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2543-2547 (1988)
95. Juan CC, Hwang J, Liu AA, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce CM, Zhang H, Wang JC and LF Liu. Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8910-8913 (1988)
96. Rasheed ZA and EH Rubin. Mechanism of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene* 22:7296-7304 (2003)
97. Pommier Y. DNA Topoisomerase I inhibitors: Chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chem Rev* 109:2894-2902 (2009)
98. Sordet O, Goldman A and Y Pommier. Topoisomerase II and tubulin inhibitors both induce the formation of apoptotic topoisomerase I cleavage complexes. *Mol Cancer Ther* 5:3139-3144 (2006)

99. Kubota N, Kanzawa F, Nishio K, Takeda Y, Ohmori T, Fujiwara Y, Terashima Y and N Saijo. Detection of topoisomerase I gene point mutation in CPT-11 resistant lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 188:571-577 (1992)
100. Negri C, Chiesa R, Cerino A, Bestagno M, Sala C, Zini N, Maraldi NM and GC Astaldi Ricotti. Monoclonal antibodies to human DNA Topoisomerase I and the two isoforms of DNA Topoisomerase II: 170- and 180-kDa isozymes. *Exp Cell Res* 200:452-459 (1992)
101. Zini N, Martelli AM, Sabatelli P, Santi S, Negri C, Astaldi Ricotti GC and NM Maraldi. The 180 kDa isoform of Topoisomerase II is localized in the nucleolus and belongs to the structural elements of the nucleolar remnant. *Exp Cell Res* 200:460-466 (1992)
102. Roca J. Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic Acids Res* 37:721-730 (2009)
103. Escargueli AE, Plisov SY, Filhol O, Cochet C and AK Larsen. Mitotic phosphorylation of DNA Topoisomerase II α by protein kinase CK2 create the MPM-2 phosphoepitope on Ser1469. *J Biol Chem* 275:34710-34718 (2000)
104. Bautista de Lucio V, Madrid Marina V and R Barrera. The molecular biology of topoisomerase II α and its importance in the acquisition of multidrug resistance in cancer. *Rev Oncol* 4:170-178 (2002)
105. Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, Hannon GJ, Lowe SW and MT Hemann. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *PNAS* 105:9053-9058 (2008)
106. Takano H, Kohno K, Matsuo K, Matsuda T and M Kuwano. DNA Topoisomerase-targeting antitumor agents and drug resistance. *Anticancer Drugs* 3:325-330 (1992)
107. Sutherland RM. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science* 240:177-184 (1988)
108. Lin RZ and HY Chang. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3:1172-1184 (2008)
109. Hoffman, RM. To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question. *Stem Cells*. 11:105-111. (1993)
110. Kunz-Schughart LA, Kreutz M and R Knuechel. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Path* 79:1-23 (1998)
111. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F and R Ebner. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9:273-285 (2004)
112. Abbott A. Cell Culture: Biology's new dimension. *Nature* 424:870-872 (2003)
113. Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitan SJ, Teicher BA and RS Kerbel. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3294-3298 (1993)
114. Shi D, Shi G, Huang G, Zhang J and E Lartigau. Chemosensitivity of radioresistant cells in the multicellular spheroids of A549 lung adenocarcinoma *J Exp Clin Cancer Res* 28:72-76 (2009)
115. Van Wezel AL. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature* 216:64-65 (1967)

- 116.Hirtenstein M, Clark J, Lindgren G and P Vretblad. Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice. *Dev Biol Stand* 46:109-116 (1980)
- 117.Nirmalanandhan VS and GS Sittampalam. Stem cells in drug discovery, tissue engineering and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *J Biomol Screen* 14:755-768 (2009)
- 118.Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ and DJ Mooney. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods* 10:855-860 (2007)
- 119.Ponce de León Suárez Valeria. 1999 Cambios en la resistencia múltiple a drogas por cultivos tridimensionales de líneas celulares de cáncer de pulmón. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM 64pp
- 120.Beketic-Oreskovic L, Duran GE, Chen G, Dumontet C and BI Sikic. Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833. *J Natl Cancer Inst* 87: 1593-1602 (1995)
- 121.Cole SPC. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemoterapy Pharm* 17:259-263 (1986)
- 122.Bordow SB, Haber M, Madafiglio J, Cheung B, Marshall GM and MD Norris. Expression of the Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) Gene Correlates with Amplification and Overexpression of the N-myc Oncogene in Childhood Neuroblastoma. *Cancer Res* 54:5036-5040 (1994)
- 123.Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, Takahara T, Yamaguchi H, Takeuchi T, Kase S, Kodaira S, Ishibiki K, Kitajima M and RM Hoffman. High in vitro-in vivo correlation of drug response using sponge-gel-supported three-dimensional histoculture and the MTT end point. *Int J Cancer* 51:489-498 (1992)
- 124.Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L and F Oesch. A multiplex polymerase Chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms. *Anal Biochemistry* 236:184-186 (1996)
- 125.Takeda S, Shimazoe T, Sato K, Sugimoto Y, Tsuruo T and A Kono. Differential Expression of DNA Topoisomerase I gene between CPT-11 acquired- and native-resistant human pancreatic Tumor cell lines: Detected by RNA/PCR-based quantitation Assay. *Biochem Biophys Res Commun* 184:618-625 (1992)
- 126.Withoff S, Smit EF, Meersma GJ, van der Berg A, Timmer-Bosscha H, Kok K, Postmus PE, Mulder NH, de Vries EGE and CHCM Buys. Quantitation of DNA Topoisomerase II α Messenger Ribonucleic Acid Levels in Small Cell Lung Cancer Cell Line and Two Drug Resistant Sublines Using a Polymerase Chain Reaction-Aided Transcript Titration Assay. *Lab Invest* 71:61-66 (1994)
- 127.Wartenberg M, Frey C, Diedershagen H, Ritgen J, Hescheler J and H Sauer. 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)
- 128.Steinman RM, Silver JM and ZA Cohn. Pinocytosis in fibroblasts. Quantitative Studies in vitro. *J Cell Biol* 63:949-969 (1974)
- 129.González Noriega A, Grubb JH, Talkad V and WS Sly. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol* 85:839-852 (1980)

130. Weaver VM, Fischer AH, Peterson OW and MJ Bissell. 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)
131. van der Deen M, de Vries EGE, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H and DS Postma. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respiratory research* 6:59-75 (2005)
132. Tunggal JK, Melo T, Ballinger JR and IF Tannock. The influence of expression of P-glycoprotein on the penetration of anticancer drugs through multicellular layers. *Int J Cancer* 86:101-107 (2000)
133. Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DSM and MJ Egorin. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumours to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 8:878-884 (2002)
134. Lunt SJ, Chaudary N and RP Hill. The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 26:19-34 (2009)
135. Sutherland R. Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumours. *Cancer* 58:16668-1680 (1986).
136. Kunz-Schughart L, Doetsch J, Mueller-Klieser W and K Groebe. Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:765-780 (2000)
137. Tunggal JK, Cowan DSM, Shaikh H and Tannock IF. Penetration of Anticancer Drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. *Clin Cancer Res* 5:1583-1586 (1999)
138. Durand RE. Slow penetration of anthracyclines into spheroids and tumors: a therapeutic advantage? *Cancer Chemother Pharmacol* 26:198-204 (1990)
139. Martin C, Walker J, Rothnie A and R Callaghan. The expression of P-glycoprotein does influence the distribution of novel fluorescent compounds in solid tumour models. *Br J Cancer* 89:1581-1589 (2003)
140. Sakata K, Kwok TT, Gordon GR, Waleh NS and RM Sutherland. Resistance to verapamil sensitization of multidrug-resistant cells grown as multicellular spheroids. *Int J Cancer* 59:282-286 (1994)
141. Garrigos M, Mir LM and Orłowski S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase further experimental evidence for a multisite model. *Eu J Biochem* 244:664-673 (1997)
142. Gow JM, Hodges LM, Chinn LW and Kroetz DL. Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms. *J Pharmacol Exp Ther* 325:435-442 (2008)
143. Bertram J, Palfner K, Hiddemann W and M Kneba. Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by hsp90 beta. *Anticancer Drugs* 7:838-845 (1996)
144. McCollum AK, TenEyck CJ, Stensgard B, Morlan BW, Ballman KV, Jenkins RB, Toft DO and C Erlichman. P-glycoprotein-mediated resistance to HSP90-directed therapy is eclipsed by the heat shock response. *Cancer Res* 68:7419-7427 (2008)
145. Eckford PD and FJ Sharom. Interaction of the P-glycoprotein multidrug efflux pump with cholesterol: effects on ATPase activity, drug binding and transport. *biochemistry* 47:13686-13698 (2008)

146. Luciani F, Molinari A, Lozupone F, Calcabrini A, Lugini L, Stringaro A, Puddu P, Arancia G, Cianfriglia M and S Fais. P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin. *Blood* 99:641-648 (2002)
147. Mutoh K, Mitsuhashi J, Kimura Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Sai K, Ozawa S, Sawada J, Ueda K, Katayama K and Y Sugimoto. A T3587G germ-line mutation of the MDR1 gene encodes a nonfunctional P-glycoprotein. *Mol Cancer Ther* 5:877-884 (2006)
148. Duan Z, Brakora KA and MV Seiden. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3:833-888 (2004)
149. Bark H, Xu HD, Kim SH, Yun J and Choi CH. P-glycoprotein down-regulates expression of breast cancer resistance protein in a drug-free state. *FEBS Letters* 582: 2595-2600 (2008)
150. Stein U, Lage H, Jordan A, Walther W, Bates SE, Litman T, Hohenberger P and M Dietel. Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells. *Int J Cancer* 97:751-760 (2002)
151. Yeh JJ, Hsu NY, Hsu WH, Tsai CH, Lin CC and JA Liang. Comparison of chemotherapy response with P-glycoprotein, multidrug resistance-related protein-1, and Lung resistance-related protein expression in untreated Small Cell Lung Cancer. *Lung* 183:177-183 (2005)
152. Tang R, Cohen S, Perrot JY, Faussat AM, Zuany-Amorim C, Marjanovic Z, Morjani H, Faval F, Corre E, Legrand O and JP Marie. P-gp activity is a critical resistance factor against AVE9633 and DM4 cytotoxicity in leukaemia cell lines, but not a major mechanism of chemoresistance in cells from acute myeloid leukaemia patients. *BMC Cancer* 9:199-209 (2009)
153. Rolff J, Dorn C, Merk J and Fichtner I. Response of patient-derived Non-Small Cell Lung Cancer xenografts to classical and targeted therapies is not related to multidrug resistance markers. *J Oncology* (en prensa) (2009)
154. Shukla S, Sauna ZE and SV Ambudkar. Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia* 22:445-447 (2008)
155. Chearwae W, Shukla S, Limtrakul P and SV Ambudkar. Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther* 5:1995-2006 (2006)
156. Limtrakul P, Chearwae W, Shukla S, Phisalpong C and SV Ambudkar. Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol Cellular Biochem* 296:85-95 (2007)
157. Wu CP, Calcagno AM and SV Ambudkar. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: Evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol* 1:93-108 (2008)

Primary research

Open Access

Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids

Ponce de León Valeria and Barrera-Rodríguez Raúl*

Address: Depto. de Bioquímica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias-SSA México. Clza. Tlalpan, 4502, C.P. 14080, México, D.F

Email: Ponce de León Valeria - valeponsua@yahoo.com.mx; Barrera-Rodríguez Raúl* - raul_barrera@iner.gob.mx

* Corresponding author

Published: 07 July 2005

Received: 29 March 2005

Cancer Cell International 2005, 5:20 doi:10.1186/1475-2867-5-20

Accepted: 07 July 2005

This article is available from: <http://www.cancerci.com/content/5/1/20>

© 2005 Valeria and Raúl; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Expression of P-glycoprotein (P-gp), the multidrug resistance (MDR) 1 gene product, can lead to multidrug resistance in tumours. However, the physiological role of P-gp in tumours growing as multicellular spheroids is not well understood. Recent evidence suggests that P-gp activity may be modulated by cellular components such as membrane proteins, membrane-anchoring proteins or membrane-lipid composition. Since, multicellular spheroids studies have evidenced alterations in numerous cellular components, including those related to the plasma membrane function, result plausible that some of these changes might modulate P-gp function and be responsible for the acquisition of multicellular drug resistance. In the present study, we asked if a human lung cancer cell line (INER-51) grown as multicellular spheroids can modify the P-gp activity to decrease the levels of doxorubicin (DXR) retained and increase their drug resistance.

Results: Our results showed that INER-51 spheroids retain 3-folds lower doxorubicin than the same cells as monolayers however; differences in retention were not observed when the P-gp substrate Rho-123 was used. Interestingly, neither the use of the P-gp-modulating agent cyclosporin-A (Cs-A) nor a decrease in ATP-pools were able to increase DXR retention in the multicellular spheroids. Only the lack of P-gp expression throughout the pharmacological selection of a P-gp negative (P-gp^{neg}) mutant clone (PSC-1) derived from INER-51 cells, allow increase of DXR retention in spheroids.

Conclusion: Thus, multicellular arrangement appears to alter the P-gp activity to maintain lower levels of DXR. However, the non expression of P-gp by cells forming multicellular spheroids has only a minor impact in the resistance to chemotherapeutic agents.

Background

Multidrug resistance to chemotherapy is one of the biggest problems in the treatment of cancer. Currently, the best understood mechanism of multidrug resistance (MDR) is associated with the overexpression of protein efflux-pump

known as P-glycoprotein (P-gp), but other non-Pgp mechanisms are also involved (i.e. MRP1, topoisomerases, glutathione-S transferases, etc). The P-gp is the protein product of the MDR-1 gene and is expressed as a transmembranal protein (Mr 170 000) capable of decreasing

the intracellular concentration of a broad range of cytotoxic agents in an energy-dependant mediated efflux [1,2]. Overexpression of P-gp in human cell lines confers resistance to many of the most effective chemotherapeutic agents used clinically in chemotherapy, including anthracyclines (e.g., doxorubicin (DXR)), *Vinca* alkaloids (e.g., vincristine), epipodophyllotoxins (e.g., etoposide), actinomycin D, paclitaxel, as well as many others non-chemotherapeutic agents like Rhodamine-123 and ethidium bromide [3]. Although the more accepted model is that the P-gp by itself extrude chemotherapeutic agents out of the cells, more recent studies suggest that P-gp activity may be modulated by cellular components such as membrane proteins, membrane-anchoring proteins or the composition of lipids themselves [4-7].

Since the first studies by Sutherland *et al* in 1979 [8], it was shown that tumour cells growing as multicellular spheroids resembles many of the behaviours found in solid tumours, including multicellular resistance (MCR) [9,10]. Using the model of multicellular spheroids, several authors have shown that P-gp, is more efficient to conferring resistance in cells cultivated as spheroids as compared to cells cultivated as monolayers [11-13]. From these observations, one question arises: Can tumour cells modulate its P-gp activity as a direct consequence of the environmental condition where grown? To address this question, we studied an NSCLC cell line named INER-51 that showed a P-gp-mediated resistance to DXR in the spheroid model. In early studies with INER-51 cells, we found that the formation of multicellular spheroids does not show any increase in mRNA for MDR-1 gene or in a differential P-gp expression in the specific areas of the spherule.

Results

Doxorubicin and Rhodamine-123 retention in spheroids

It is well known that multicellular spheroids are more resistant to chemotherapeutic drugs than the same cell cultures as monolayers [11,12]. With the aim to evaluate differences in P-gp activity in multicellular spheroids with respect to monolayers, two P-gp substrates were used (DXR and Rho-123). Both compounds were chosen, because they are good P-gp substrates with an autofluorescence capacity. Our results showed that in monolayers the amount of DXR retained in the cells was in direct proportion to the drug added to the medium (Figure 1). In contrast, multicellular spheroids showed a lower capacity for DXR retention (3-fold lower) than monolayers. Interestingly, this poor retention was not observed when Rho-123 was used as P-gp substrate because the Rho-123 levels retained were equal in both types of cultures (box insert in Figure 1a).

Since the drug-retention is a dynamic process that involves drug uptake (simple diffusion) as well as drug linkage (diffusion vs. expulsion mediated for an active mechanism), we tried to determine whether a more efficient P-gp-dependent drug removal was responsible for allowing lower intracellular DXR concentrations. Thus, drug-removal in monolayers previously loaded with 30 μ M of DXR during 30 min showed a first order decay reaction with a half-time of drug concentration at the first 5 minutes interval that indicated the presence of an active transport mechanism (Figure 1b). However, for multicellular spheroids the presence of active transport was not evident since it was not possible to load the cells with sufficient amounts of DXR to determine the efflux values. A common observation in these experiments was that a constant amount of DXR was retained for a longer period of time (45 minutes) in cells grown as monolayers. A possible explanation could be from the presence of positively charged-DXR, which stores in acidic vesicles as chromaffin granules and lysosomes [20,21].

Circumvention of DXR retention with P-gp reversal agents

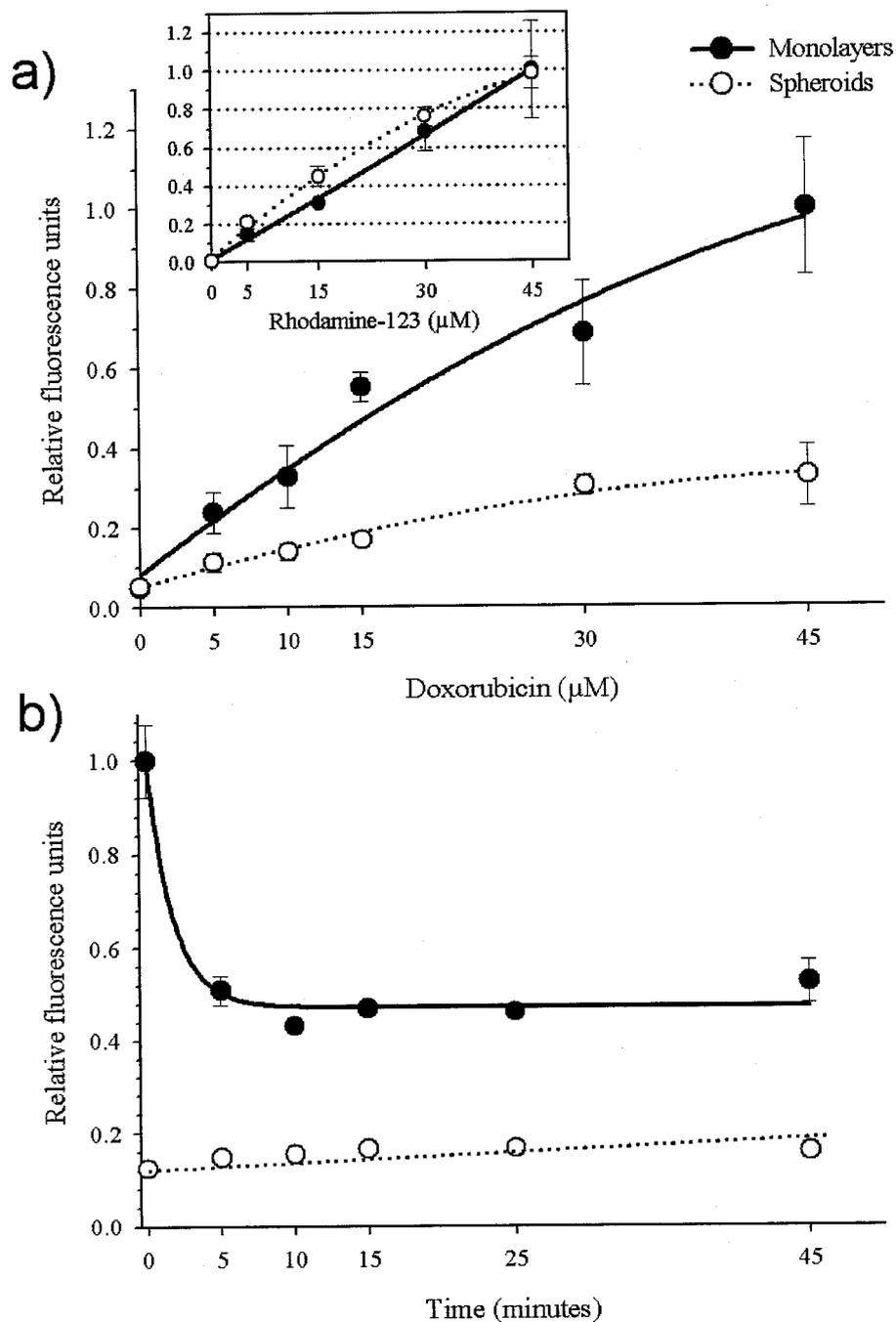
With the aim to determine how much the P-gp influences the levels of DXR retained, the modulator agent Cs-A was employed. As shown in the Figure 2, the incubation of monolayers with 5 μ M of Cs-A efficiently enhances (2-fold) the intracellular DXR fluorescence in direct relation to reversal agent concentration. Surprisingly, the P-gp-modulation activity of Cs-A was not evident in multicellular spheroids because no effect in the intracellular DXR retention could be seen. Also, other reversal agents, like SDZ PSC 833 and verapamil were not able to increase DXR retention, neither in monolayers nor in multicellular spheroids (*data not shown*).

Effect of ATP-depletion in DXR retention

P-gp is a protein that belongs to the ABC binding cassette protein, for which efficient drug efflux needs ATP hydrolysis. Thus, with the propose to achieve more information about the P-gp function, we decided to inhibit the P-gp activity through depletion of ATP-pools. Three metabolic poisons were used to be sure of complete ATP-depletion in multicellular spheroids. Figure 3 shows that ATP-depletion did induce a 1.5-fold increase of DXR retention in cells maintained as monolayers but none effect was again seen when in ATP-depleted multicellular spheroids.

Achieving the PSC-1 mutant clone non-expressing P-gp

With no possibility of obtaining irrefutable evidence of P-gp modulation from multicellular spheroids, we decided to eliminate the P-gp expression from the lung cancer line. Therefore, through the co-selection of the parental cell line INER-51 with 5 μ M of DXR and 5 μ M of SDZ PSC 833, we were able to obtain one mutant cell clone that did not express P-gp, which was named PSC-1 line (Figure

**Figure 1**

Dose-dependence of doxorubicin-retention in INER-51 cells. (a) Tumour cells growth as monolayers (filled circles) or multicellular spheroids (open circles) were incubated with increased concentrations of DXR or Rho-123 (Insert box) for 30 min and then intracellular fluorescence was determined by spectrofluormetry. (b) Time-course of DXR efflux in INER-51 cells. Monolayers (filled circles) and a multicellular spheroids (open circles) were previously loaded with 30 μM of DXR for 30 min and afterwards the remaining DXR was quantitated in several intervals of time. Each point represents the mean of at least 3 experiments and error bars are the standard error of the mean.

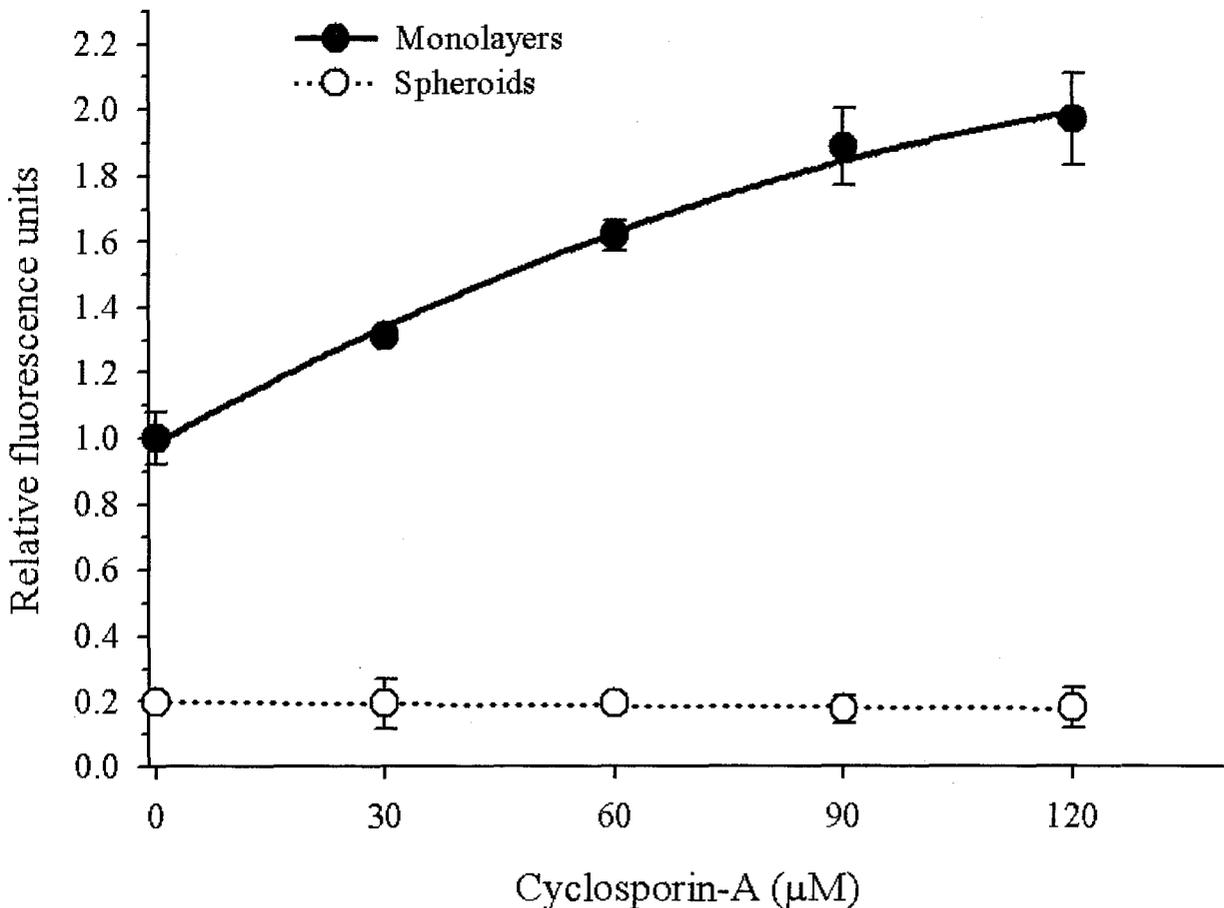


Figure 2
Circumvention of doxorubicin-retention by cyclosporin-A (Cs-A). INER-51 cells growth as monolayers (filled circles) or multicellular spheroids (open circles) were treated with increase concentrations of Cs-A for 1 hour previous to being loaded with 30 µM of DXR for 30 min in presence of reversal agent. Doxorubicin retained was determinate by spectrofluometry. Each point represents the mean of at least 3 experiments and the error bars are the standard error of the mean.

4a). *In vitro* RT-PCR analysis of other MDR-related genes did not show qualitative differences between parent and mutant cells (Figure 4b). The amplification experiments showed that both cells lines express with approximately with the same intensity transcripts for topoisomerase I, topoisomerase II α and topoisomerase II β but neither of them expressed the multidrug resistance-associated protein (MRP1) or glutathione-S transferase- μ .

DXR retention and drug cytotoxicity in PSC-1 cells

The similarities between INER-51 cells (P-gp^{pos}) and PSC-1 cells (P-gp^{neg}), allowed us the possibility to evaluate

whether or not the lower DXR-retention levels were mediated by a positively modulated P-gp-mechanism. The incubation of PSC-1 spheroids with increasing DXR concentrations showed a significant increase in the drug retention (1.8-fold) in comparison to INER-51 spheroids and was only 1.6-fold lower than PSC-1 growth as monolayers (Figure 5). When Rho-123 was assayed, an increase in the retention of the dye relative to the parental line INER-51 as monolayers was evident. In PSC-1 spheroids, the levels of Rho-123 retention were similar in both INER-51 monolayers and multicellular spheroids (box insert in Figure 5).

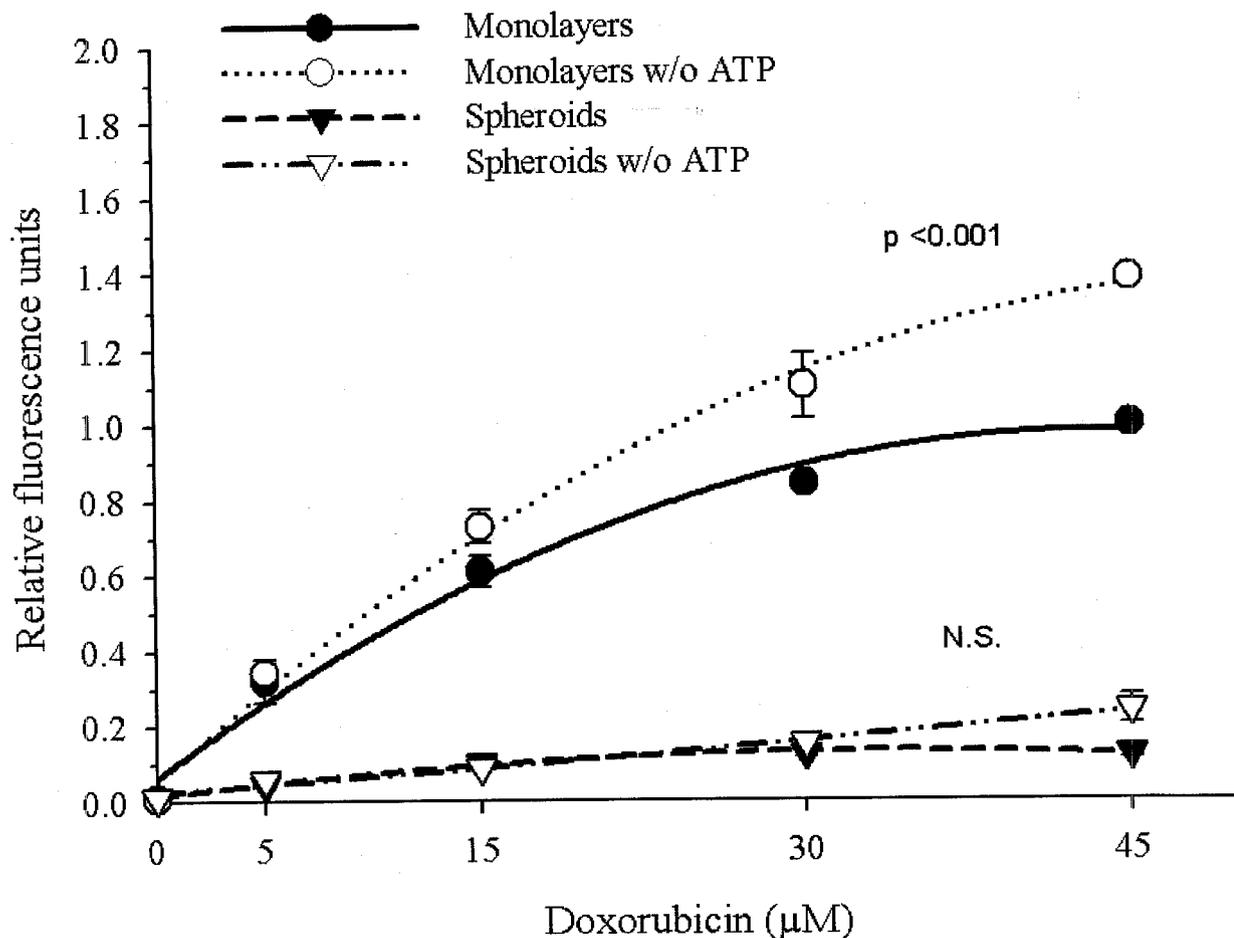


Figure 3

Effect of ATP-depletion in doxorubicin-retention. INER-51 cells as monolayers or multicellular spheroids were pre-incubated (open symbols) or not (filled symbols) with 1 mM sodium-cyanide, 10 mM sodium-fluoride, 10 mM sodium azide before the addition of increased DXR concentrations. The intracellular DXR-fluorescence was evaluated by spectrofluometry. Each point represents the mean of at least 3 experiments and the error bars are the standard error of the mean. The Student's t-test for paired data was performed to identify changes in DXR retention. The results were considered to be significant when $p < 0.05$. NS: no significant.

Several techniques have been used to evaluate the MCR in multicellular spheroids. Since in previous experiments we were unable to successfully disaggregate multicellular spheroids through trypsin-based protocols, we decided to evaluate the MCR using the MTT assay (which as been previously evaluated by Furukawa *et al* [17]). Interestingly, this assay showed that the increase in DXR retention had only a minor impact in the MCR. Thus, PSC-1 spheroids were able to maintain their resistance to DXR or etoposide as the parental INER-51 cells (Figure 6a,b) with only minor

changes in the IC_{50} values (Table 1). Only when PCS-1 cells were assayed against the cytotoxic effect of methotrexate (which use another detoxification via previous to P-gp), differences between INER-51 cells and PSC-1 cells could be seen (Figure 6c).

Discussion

It is well known that the three-dimensional arrangement evoke deeper structural changes in the cells to maintain the integrity of the multicellular structure, some of which

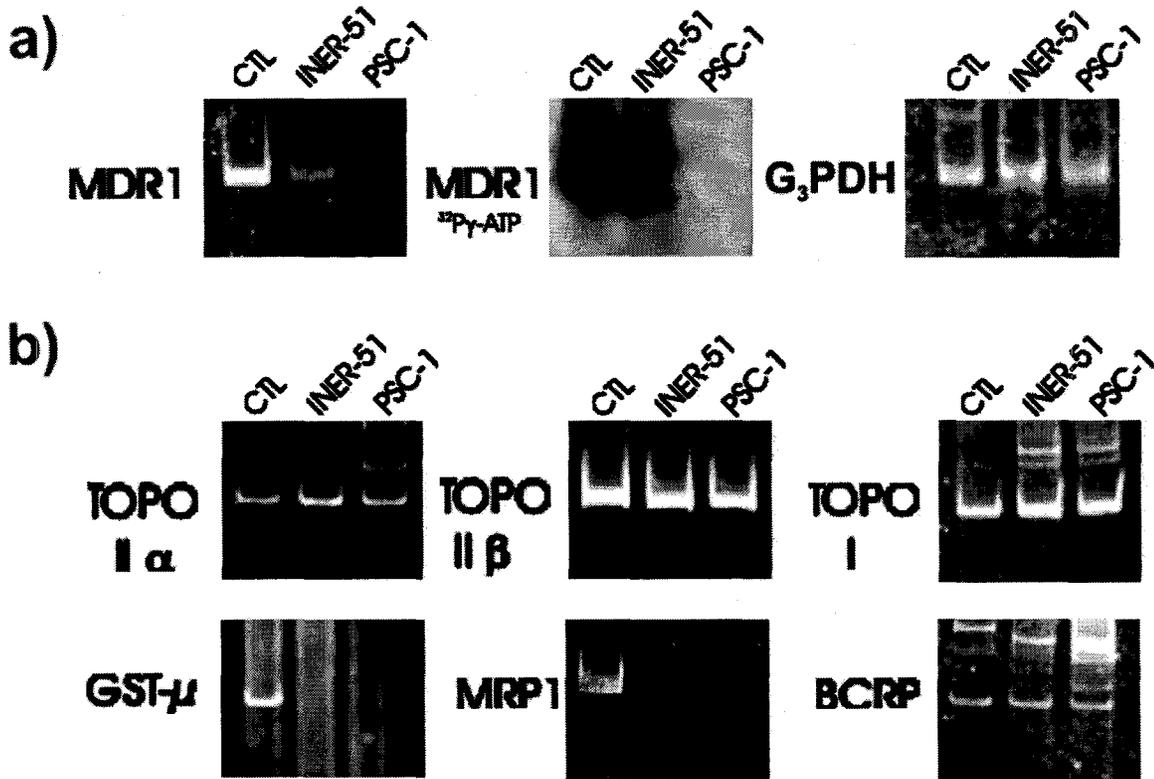


Figure 4

RT-PCR analysis of the levels of expression for MDR genes in the parental cell line INER-51 as well as the PSC-1 cell clone. a) Amplification of MDR-1 gene visualized by ethidium bromide (left) or autoradiograph (middle). The expression of G₃PDH gene was used as a constitutive control for the integrity of the RNA molecules. b) Amplification by RT-PCR of other non-MDR-1 genes related to MDR phenotype. As control (CTL) of gene expression, the next cell lines and tissues were used: INER-37 cell line for MRP1 and GST-μ; A427 cell line for MDR-1; HeLa cell line for topoisomerase I, topoisomerase IIα and topoisomerase IIβ; finally, placental tissue was used as a control of BCRP expression.

include: a) the expression of proteins of ECM [22]; b) membrane protein anchoring [23,24]; c) heat shock proteins [25] and d) adhesion proteins as well as changes in lipid membrane composition and hypoxia [26-29]. Another phenomenon frequently observed in tumour cells growing as multicellular spheroids is the acquisition of MCR. In spheroids cultures as well in monolayer systems one of the major mechanisms to confer resistance is shown by the expression of P-gp. However, some evidence suggests that to confer MCR, the P-gp also seems to work more efficiently [11,12]. Recent data suggests that P-gp

activity can be modulated through the interaction with diverse cellular components, some of which are also altered when cells are multicellular spheroids [4-7,11,12]. Thus, it would be interesting to know if to acquire MCR, tumour cells spheroids can modulate its P-gp activity.

Our findings suggest that a more efficient P-gp-mediated efflux seems to be responsible for maintaining lower levels of DXR in INER-51 spheroids than cells in monolayer cultures. However, this P-gp mediated drug efflux did not seem to operate under the same conditions with others

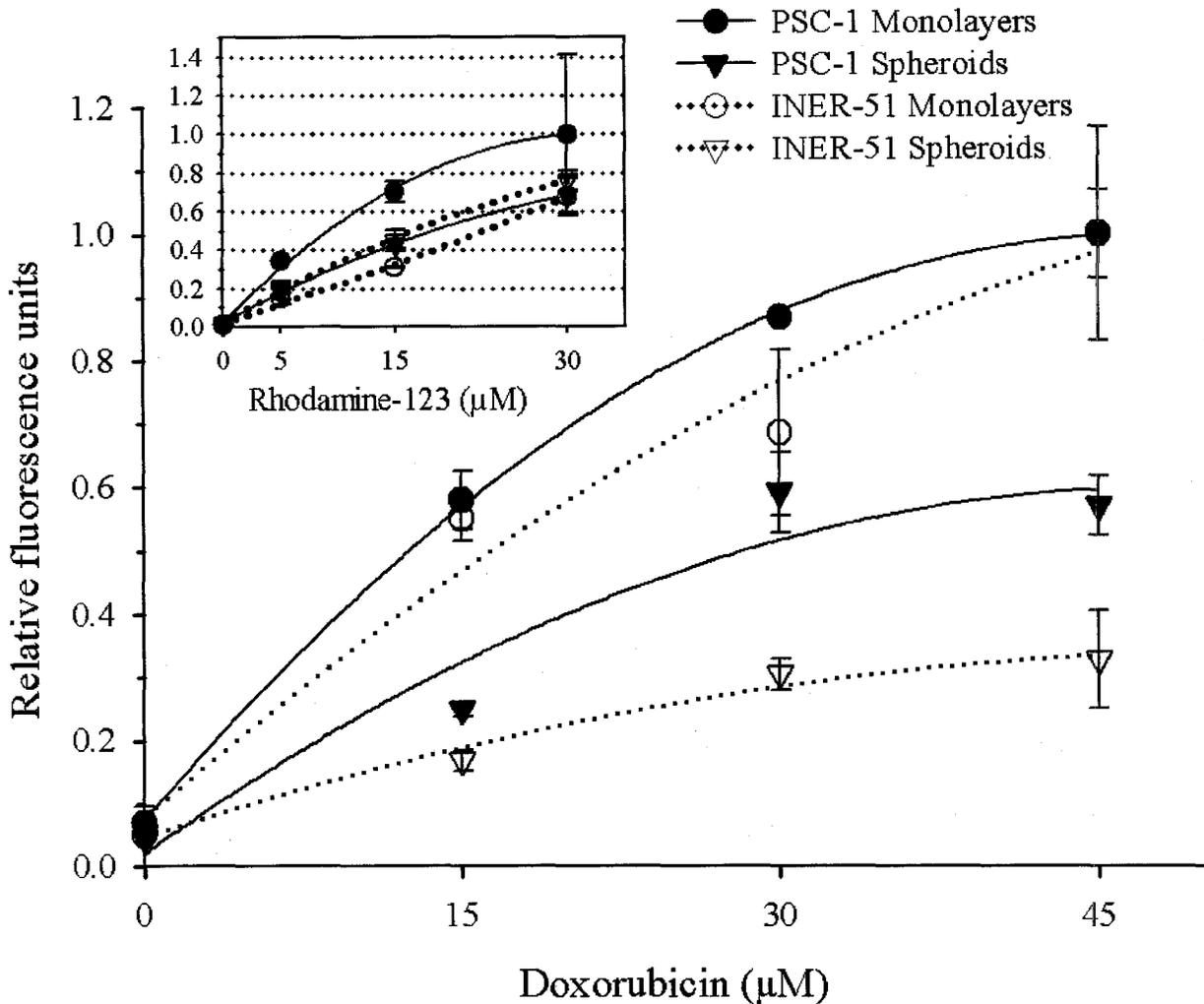


Figure 5

Comparative doxorubicin retention of PSC-1 cells and INER-51 cells. PSC-1 tumour cells growth as monolayers (filled circles) or multicellular spheroids (filled triangles) and INER-51 monolayers (open circles) or multicellular spheroids (open triangles) were incubated with increased concentrations of DXR (as in Figure 1) and then intracellular fluorescence was determined by spectrofluometry. *Insert box.* Rhodamine-123-retention in PSC-1 cell growth as monolayers or multicellular spheroids.

substrates, because when the lipophilic cation Rho-123 was used, the levels of retention were similar and independent of the culture conditions.

Under the spheroid condition, P-gp appears to obey different regulatory mechanisms since neither Cs-A treatment nor ATP-depletion were able to increase the levels of DXR into the spherules. Other non-P-gp mediated mechanisms also appear to be operating to maintain lower DXR levels in the multicellular spheroids, because the lack

of P-gp expression did not reach levels of DXR comparable to the monolayer's cultures and had only a minor impact in the acquisition of MCR to chemotherapeutic agents, including DXR.

Some evidences has shown that the membrane-cell composition can modulate the transbilayer movement rate of MDR-type drugs across the membrane and consequently affects the "competition" between the active P-gp-mediated drug efflux and the passive drug uptake: i.e. retention

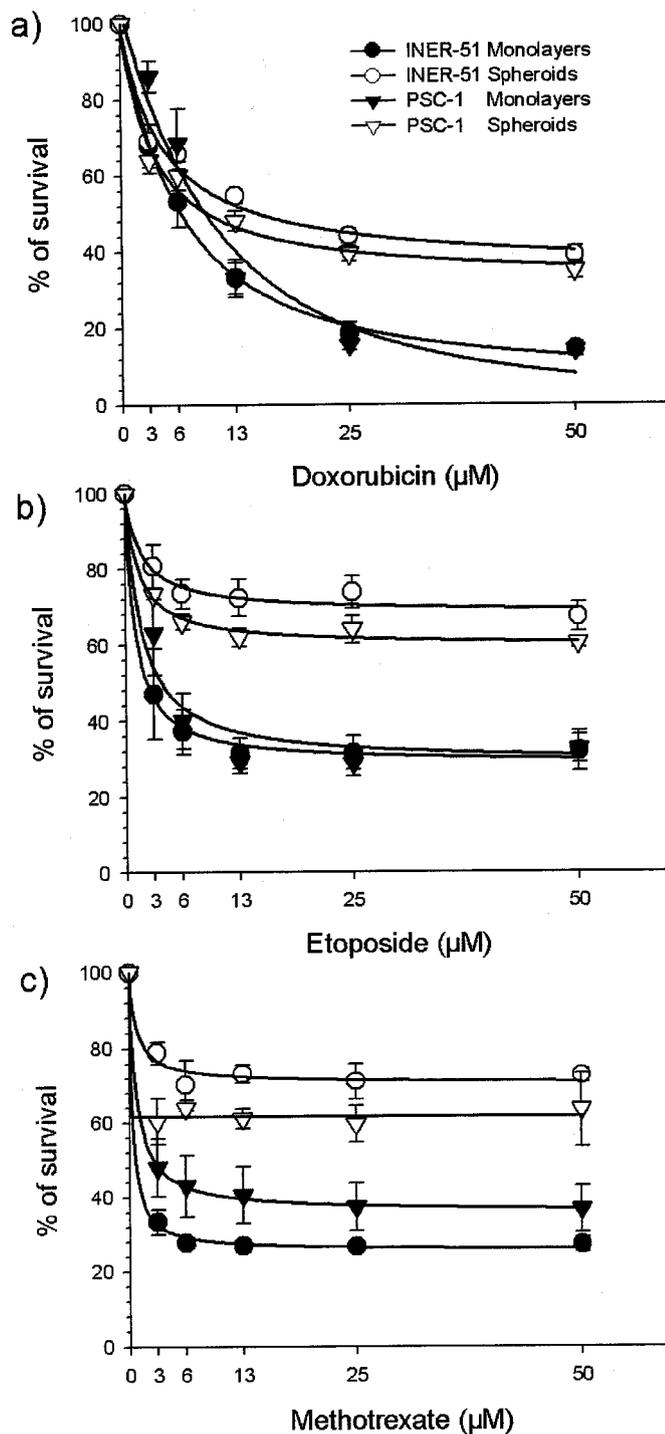


Figure 6

Cytotoxicity of doxorubicin (a), etoposide (b) and methotrexate (c) in monolayers or multicellular spheroids from PSC-1 (P-gp^{neg}) clone cells in comparison to the parental INER-51 cell line. Cytotoxicity was measurement by the MTT colorimetric assay and expressed as percent growth inhibition in comparison with the untreated tumour cells. Each point represents the mean of at least 3 independent experiments and error bars are the standard error of the mean

Table 1: Indices of cytotoxicity (IC₅₀) to several cancer drugs founded in multicellular spheroids and monolayer.

Drug	Monolayers IC ₅₀ (μM)			Multicell. spheroids IC ₅₀ (μM)		
	INER-51	PCS-1	RR	INER-51	PCS-1	RR
Doxorubicin	6.2	9.2	1.4	15	9.8	0.6
Etoposide	2.2	4.1	1.8	>50	>50	----
Methotrexate	0.8	2.8	3.5	>50	>50	----

Drug exposition was continuous for 72 hours and drug cytotoxicity was performed by MTT assay. IC₅₀: Fifty percent of the decrease in the survival rate. RR: The value of relative resistance of INER-51 cells vs PCS-1 cells as monolayers or multicellular spheroids.

[30]. Particularly, DXR has shown to have a lower rate of penetration through membranes due to its specific interactions with cardiolipin [31,32]. Since membrane changes affecting plasma membrane do not confer resistance themselves but could drive the P-gp function [33-35], we hypothesize a possible drawing to understand how P-gp successfully maintains lower DXR concentrations. In this picture, a delay in the rate of passive transbilayer movement of DXR through the plasma membrane results in an enhanced ability of P-gp to recognize and extrude it out of the spheroids. Thus, when P-gp is absent (as in PCS-1 cells), the saturation of lipid targets permit the increase of the DXR concentration into the multicellular spheroids. Enhanced efficiency of P-gp to extrude substrates has been fully demonstrated by different members of the DXR and rhodamine dry analogues, with each one having different lipophilic properties [36].

Several studies have shown that the use of modulator agents provoke the sensitisation of cell growth as multicellular spheroids [37-39]. The efficacy of these agents is due to the higher permeability rate in relation to P-gp substrates [40]. However, when INER-51 spheroids were pre-treated with 10 μM of the modulator agent of Cs-A, no increase in DXR retention was observed. A similar phenomenon was observed in multicellular spheroids treated with verapamil [38,39]. Today, a number of studies using various techniques have suggested a probable model of interaction between P-gp-substrates with modulators agents and how these molecules bind to different sites on P-gp [41]. Four binding sites have been identified on P-gp of which vinblastine and daunorubicin bind to the site I, whereas modulators bind to site IV. In this model, all the binding sites display allosteric interaction between each one of them, thus affecting P-gp-mediated activity. In addition, an unrecognised binding site has been proposed for Rho-123 [42-44]. Thus, the failure of Cs-A to inhibit P-gp-mediated DXR efflux may be a consequence of changes in the P-gp affecting the modulator-binding site or the allosteric inhibition with some hypothetical molecule. Recently, in cells with MDR-phenotype, it has been demonstrated that a specific interaction exists between P-gp

and HSP-90 [45]. If spherules formation elicits the expression of HSP-90, which is able to bind P-gp, the failure of Cs-A inhibition might be understood. Furthermore, the allosteric inhibition of the modulator site by unknown factors could be an explanation for the common failure seen when solid tumours, including lung cancer tumours, are treated with reversal agents [46].

Another interesting observation came from the impact of ATP depletion in DXR retention. For this experiment we used a metabolic cocktail poison to be certain of the ATP pools depletion. However, this treatment was unable to increase DXR retention in multicellular spheroids but its effect was evident in monolayers. Since, there is a general consensus in the literature that P-gp is an energy-driven pump, where the energy is provided by the hydrolysis of ATP, our data are puzzle. Nevertheless, using competitions assays, Biswas EE [47], demonstrated that NBD1 of histidine permease (*Hisp*) and maltose transporter protein (*Malk*), two ABC members, can function as a general nucleotide binding domain, with a nucleotide preference CTP>GTP>ATP>>UTP. Thus, the impact of ATP depletion in DXR retention is not understood for the moment.

In recent years, it has become clear that the multiple non-P-gp mediated mechanisms may be operational in tumour spheroids to confer MCR [48]. One mechanism most recently described is the breast cancer resistance protein (BCRP), which is a drug pump efflux able to efficiently extrude DXR [49]. Since INER-51 cells express mRNA for BCRP, we cannot discard the activity of this protein as a mechanism that helps to maintain lower DXR retention levels. However, the activity of BCRP as pump efflux is higher for Rho-123 efflux than DXR, although their contribution to the drug retention in spheroids is controversial [50].

In addition to DXR resistance, INER-51 spheroids also showed resistance to other anticancer drugs such as etoposide and methotrexate. Commonly, the etoposide-resistance involves alterations in the nuclear target enzymes topoisomerases. Oloumi *et al* [51] indicate that alterations

in subcellular localization of topoisomerases type II may have an important role in resistance to cytotoxic agents when cells are in a close contact. Whereas Luo *et al* [52] showed that phosphorylation of topo II alpha was reduced at least 10-fold in the outer cells of V79 spheroids relative to monolayers. However, the role of topoisomerase II alpha as a mechanism to confer MCR to etoposide in INER-51 spheroids has not been evaluated yet and will be considered for future experiments.

A different situation can be speculated for the resistance to methotrexate. Under physiological conditions, the weak acid methotrexate tends to be in the charged form and is taken up into cells largely by a folate transport mechanism. Unlike DXR, methotrexate is not sequestered in membranes nor in acidic endosomes, but it may be "trapped" inside cells by polyglutamation [53]. Thus, the differences in methotrexate resistance of INER-51 cells relative to PSC-1 cells could arise from differences in P-gp-independent metabolic pathways.

Finally, several reports have shown a lower MDR-1 expression in NSCLC [54]. However, some authors have shown an important role of P-gp expression in lung cancer tumours and particularly in lung cancer diagnosed in people whom smoke tobacco [55-57]. Due to our findings, it would be interesting to evaluate both the levels of P-gp expression as well as P-gp activity in lung cancer tumours.

Conclusion

Our results suggest that in INER-51 cells cultured as multicellular spheroids, a more efficient P-gp activity is responsible for maintaining lower retention levels of DXR in comparison to the P-gp activity of cells grown as monolayers. Interestingly, whereas the P-gp expression helps maintain lower levels of DXR in the multicellular spheroids, the mechanisms that govern the MCR seems to be different because the lack of P-gp-expression only showed a minor impact of resistance to several chemotherapeutic drugs, suggesting that other non-P-gp mechanisms are also operating.

Methods

Chemicals

Doxorubicin (DXR) was provided by Farmitalia-Carlo Erba, whereas Cyclosporin-A was provided by Sandoz Farma, whereas SDZ PSC 833 was gift by Novartis. Rhodamine-123 (Rho-123) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma (St. Luis, MO, USA). All of the working solutions were initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and posterior dilutions were put in culture medium.

Cell lines and culture conditions

The lung cancer cell line INER-51 and its clone PSC-1 (non-expressing P-gp or P-gp^{neg}) were grown as monolayer cultures in RPMI-1640 medium at 37°C in 5% CO₂. INER-51 is a NSCLC cell line established in our laboratory from pleural effusion of patient diagnosed with primary lung cancer without previous chemotherapy treatment. The kidney cell line A498 (expressing P-gp) and the lung adenocarcinoma cell line INER-37 (expressing MRP1) were used as controls of P-gp function and MRP1 expression, respectively. The culture medium was supplemented with 10% FCS (Sigma, Co. St. Luis, MO, USA), 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin.

Culture of monolayers and multicellular spherules

Monolayer cells were passed a week by trypsin-EDTA solution (Invitrogen™, USA). To obtain multicellular spheroids, 3.5×10^5 exponentially tumour cells were seeded in 1% agarose-coated (24-well/plate) in RPMI-1640 complete medium [14]. Cultures were routinely grown for 72 hours to acquire multicellular spheroids of approximately of 500 µm of diameter.

P-gp non-expressing mutant clones

In order to obtain one mutant clone with the capacity to not express P-gp, INER-51 cells were treated as described by Beketic-Oreskovic, *et al* [15]. Briefly, 1×10^6 tumour cells were seeded in a T₂₅ plastic tissue culture flask (Falcon, USA). When the cell culture achieved a semi-confluent grade, the culture medium was removed and fresh complete medium was added containing 5 µM DXR and 5 µM of SDZ PSC 833. The cells were maintained under this condition during two weeks until some survival clones were evident upon microscopic observation. A total of 6 survival clones were isolated, propagated for a month in absence of drugs, and tested for MDR1 expression by *in vitro* RT-PCR. One mutant clone that manifested stable for *mdr1*^{neg} phenotype was selected and cloned again. Each clone obtained was tested for MDR-1 expression again. Finally, the clone PSC-1 was further propagated and used for studies in the present communication.

Drug resistance in monolayers or multicellular spheroids

The level of resistance to drugs was determined with the use of MTT assay as previously described by S. Cole [16] and on multicellular systems as evaluated by Furukawa, *et al* [17]. For monolayers, 7×10^3 cells/well were plated in 96-well/plate (Costar, USA) and drugs were added in different concentrations per well. In the case of multicellular spheroids, they were obtained as described above and were fed with fresh complete medium containing different drug concentration. After 72 hours, the culture

medium was retired and MTT reagent diluted in PBS was added to obtain a final concentration of 2 mg/ml. After incubation for 4 hours, individual spheroids surrounded with formazan crystals were transferred into 1.5 ml eppendorf tubes. Cells in monolayers were washed carefully with PBS once. Both monolayers and multicellular spheroids crystals were dissolved by addition of 100% DMSO for 20 min with occasional shaking. Absorbance at 540 nm was measured using an automated microplate reader (Labsystem Multiskan MS, Finland). In each experiment, the drug determination was analysed in six individual wells. Cell survival was estimated as a percentage of the corresponding control. Drug-cytotoxicity was assayed by the IC₅₀, corresponding to the 50% decrease in cell survival rate respective to not-drug treated cultures.

Doxorubicin and Rhodamine-123 retention assays

Exponentially growing cells (3.5×10^5) were seeded 72 hours prior to treatment with drugs in 1% agar-coated 24-well tissue culture plates as described above. Either multicellular spheroids or monolayer cells were incubated with increased concentrations of DXR or Rho-123 for 30 min and then washed with fresh drug-free medium twice and PBS once. Cell suspensions from monolayers were obtained by trypsinization whereas multicellular spheroids were recovered using micropipette tips. To exclude artefacts arising from DXR quenching by binding to DNA and accumulating in acidic organelles, DXR was extracted from spheroids with the method described by Wartenberg *et al* [18]. Finally, intracellular DXR or Rho-123 were determined by spectrofluormetry (Phototechnology, International, Princeton, New Jersey, USA) at λ_{em} 580 nm and λ_{ex} 427 or λ_{em} 510 nm and λ_{ex} 480 respectively.

Doxorubicin efflux assays

The efflux assays were based on those previously described [19]. Briefly, monolayers or multicellular spheroids were drug loaded with DXR (30 μ M) throughout incubation at 37°C in 5% CO₂ for 30 min. The loading cells were then washed with a complete drug-free ice-cold medium and either placed on ice or incubated at 37°C in 5% CO₂ for different intervals of time. This incubation allowed drug efflux to occur, and during experimental time the remaining drug was quantitated by spectrofluormetry as described above.

Circumvention of P-gp-mediated efflux with Cs-A or ATP-depletion

For evaluation of P-gp activity, monolayers or multicellular spheroids were pre-incubated for 1 hour with increasing drug concentrations of cyclosporin-A (Cs-A). After pre-incubation, multicellular spheroids were loaded for 30 min with 30 μ M of DXR in presence of the reversal agent and afterwards the DXR uptake was assessed again.

For ATP-depletion, cells were pre-incubated for 20 min at 4°C in PBS/BSA (1 mg/ml) containing 1 mM sodium-cyanide, 10 mM sodium-fluoride and 10 mM sodium azide prior to the addition of DXR. After centrifugation at 1000 \times g for 15 min, both monolayers and multicellular spheroids were loaded with different DXR concentrations in the presence of ATP synthesis inhibitors and the fluorescence was measured as mentioned above.

In vitro Reverse transcriptase-PCR assay

Total RNA was extracted from the cell lines with Trizol reagent (Invitrogen™, USA) according to manufacturer's instructions. Single stranded cDNA was synthesized by reverse transcription from 5 μ g of total RNA using Superscript™ RNase Reverse Transcriptase (Invitrogen™, USA) and oligo-dT₁₆₋₁₈. The amplification was performed in a final volume of 25 μ l, containing 0.5 μ l cDNA, 50 pM of each oligonucleotide primer, 30 μ M of each dNTPs, 2.5 units of Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) and 50 mM KCl. Amplification was carried out in a Thermal Cycler (Programmed Thermal Controller, model PTC-100, MJ Research Inc., USA) for 35 cycles of denaturalisation at 94°C for 1 min, annealing at 55–60°C for 2 min, and polymerisation at 72°C for 3 min. The PCR primers and expected product size were as follows: For MDR-1, forward: 5'-cccatcattgcaatagcagg-3' and reverse: 5'-gttcaacttctgctctga-3 [150 bp]; MRP1, forward: 5'-tctctcccgacatgaccgagg-3' and reverse: 5'-ccaggatgatgccccgacttc-3' [140 bp]; topoisomerase II α , forward: 5'-ttaaaggccaagtcagttaaac-3' and reverse: 5'-gtataacaatatcatcaagattgt [343 pb]; topoisomerase II β , forward: 5'-gaagtgttactagtaaaatacagt-3' and reverse: 5'-cataatcttccatagcgttaaggtt-3' [336 bp]; topoisomerase I, forward: 5'-aagcagaggaagtagctacg-3' and reverse: 5'-gctcatctgttccgagctt-3' [206 bp]; GST- μ , forward: 5'-gaactcctgaaaagcctaag-3' and reverse: 5'-gttgggtcaaatatcgggtgg-3' [250 bp]; G3PDH, forward: 5'-tggggaaggtgaaggtcgga-3' and reverse: 5'-gaaggggtcattgatggca-3' [110 bp].

List of abbreviations

Cs-A: Cyclosporin-A

DXR: Doxorubicin

MCR: Multicellular resistance

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

NSCLC: Non-small cell lung cancer

P-gp: P-Glycoprotein

Rho-123: Rhodamine 123

MDR: Multidrug Resistance

DMSO: Dimethyl sulfoxide

Authors' contributions

All author(s) contributed equally to this work.

Acknowledgements

We are indebted to Ms. Christine Wilson for linguistic revision and Rodolfo Ocadiz Delgado (CINVESTAV-IPN) for critical and technical review of the manuscript.

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D. Sc. Degree for Ponce de Leon Suarez, V., at DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

References

- Hrycyna C: **Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoprotein involved in multidrug resistance.** *Cell Dev Biol* 2001, **12**:247-256.
- Sauna ZE, Smith MM, Müller M, Kerr KM, Ambudkar SV: **The Mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein.** *J Bioenergetics Biomembranes* 2001, **33**:481-491.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:48-58.
- Takeshita H, Kusuzaki K, Ashihara T, Gebhardt MC, Mankin HJ, Hirasawa Y: **Actin organization associated with the expression of multidrug-resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance.** *Cancer Lett* 1998, **126**:75-81.
- Luciani F, Molinari A, Lozupone F, Calcabrini A, Lugini L, Strigaro A, Puddu P, Arancia G, Cianfriglia M, Fais S: **P-Glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin.** *Blood* 2002, **99**:641-648.
- Callaghan R, van Gorkom LC, Epanand R: **A comparison of membrane properties and composition between cell lines selected and transfected for multi-drug resistance.** *Br J Cancer* 1992, **66**:781-786.
- Le Moyec L, Tatoud R, Degeorges A, Calabresse C, Bauza G, Eugene M, Calvo F: **Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals cellular lipids involved in resistance to adriamycin and taxol by the K562 leukemia cell line.** *Cancer Res* 1996, **56**:3461-3467.
- Sutherland RM, Eddy HA, Bareham B, Reich K, Vanantwerp D: **Resistance to adriamycin in multicellular spheroids.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979, **5**:1225-1230.
- Mueller-Klieser W: **Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanism to clinical applications.** *Am J Physiol* 1997, **273**:C1109-1123.
- Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitain SJ, Teicher BA, Kerbel RS: **Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:3294-3298.
- Kolchinsky A, Roninson IB: **Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines.** *Anticancer Res* 1997, **17**:3321-3327.
- Desoize B, Gimonet D, Jardillier JC: **Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance.** *Anticancer Res* 1998, **18**:4147-4158.
- Kerbel RS, Rak J, Kobayashi H, Man MS, St Croix B, Granham CH: **Multicellular resistance: a new paradigm to explain aspects of acquired drug resistance of solid tumors.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994, **59**:661-672.
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Landman AJ: **A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids.** *Cancer Res* 1977, **37**:3639-3643.
- Beketic-Oreskovic L, Durán GE, Chen G, Dumontet C, Sikic BI: **Decrease mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of mdrl gene activation by the Cyclosporin PCS 833.** *J Natl Cancer Inst* 1995, **87**:1593-1602.
- Cole SP: **Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1986, **17**:259-263.
- Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, Takahara T, Yamaguchi H, Takeuchi T, Kase S, Kadaira S, Ishibiki K, Kitajima M, Hoffman RM: **High in vitro-in vivo correlation of drug response using sponge-gel-supported three-dimensional histoculture and the MTT end point.** *Int J Cancer* 1992, **51**:489-498.
- Wartenberg M, Frey C, Diederhagen H, Ritgen J, Hescheler J, Sauer H: **Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids.** *Int J Cancer* 1998, **75**:855-863.
- Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM: **Functional expression of human P-glycoprotein from plasmids using vaccinia virus-bacteriophage T7 RNA polymerase system.** *Methods Enzymol* 1998, **292**:456-473.
- Moriyama Y, Manabe T, Yoshimori T, Tashiro Y, Futai M: **ATP-dependent uptake of anti-neoplastic agents by acidic organelles.** *J Biochem (Tokyo)* 1994, **115**:213-218.
- Schindler M, Grabski S, Hoff E, Simon SM: **Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in Adriamycin resistant cells (MCF-7adr).** *Biochemistry* 1996, **35**:2811-2817.
- Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U: **Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids.** *Cancer Res* 1984, **44**:3090-3097.
- Bichat F, Mouawad R, Solis-Recendez G, Khayat D, Bastian G: **Cytoskeleton alteration in MCF7R cells, a multidrug resistant human breast cancer cell line.** *Anticancer Res* 1997, **17**:3393-3402.
- dit Faute MA, Laurent L, Ploton D, Poupon MF, Jardillier JC, Bobichon H: **Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant.** *Clin Exp Metastasis* 2002, **9**:161-168.
- Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Gawron A, Kandefer-Szerszen M: **The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and tumour cells.** *Folia Histochem Cytobiol* 2002, **40**:31-35.
- Rosi A, Grande S, Luciani AM, Barone P, Mlynarik V, Viti V, Guidoni L: **¹H MRS studies of signals from mobile lipids and from lipid metabolites: comparison of the behavior in cultured tumor cells and in spheroids.** *NMR Biomed* 2004, **17**:76-91.
- Hazlehurst LA, Dalton WS: **Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies.** *Cancer Metastasis Rev* 2001, **20**:43-50.
- Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J, Sauer H: **Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species.** *FASEB J* 2003, **17**:503-505.
- Pedro D, Beltran PJ, Wang YF, Bucana CD, Yoon SS, Deguzman ACP, Fidler IJ: **Cell density-dependent regulation of mdrl gene expression in murine colon cancer cells.** *Int J Oncol* 1996, **9**:865-878.
- Tunggal JK, Melo T, Ballinger JR, Tannock IF: **The influence of expression of P-glycoprotein on the penetration of anticancer drugs through multicellular layers.** *Int J Cancer* 2000, **86**:101-107.
- Tritton TR: **Cell surface actions of adriamycin.** *Pharmacol Ther* 1991, **49**:293-309.
- Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM: **Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids.** *Biochim Biophys Acta* 1980, **597**:1-14.
- Martin C, Walker J, Rothnie A, Callaghan R: **The expression of P-glycoprotein does influence the distribution of novel fluorescent compounds in solid tumour models.** *Br J Cancer* 2003, **89**:1581-1589.
- Alemán C, Annereau JP, Liang XJ, Cardarelli CO, Taylor B, Yin JJ, Aszalos A, Gottesman MM: **P-glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential.** *Cancer Res* 2003, **63**:3084-3091.

35. Ferte J: **Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:277-294.
36. Eytan GD, Regev R, Oren G, Assaraf YG: **The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation.** *J Biol Chem* 1996, **271**:12897-12902.
37. Ehrlich PH, Moustafa ZA, Archinal-Mattheis AE, Newman MJ, Bair KW, Cohen D: **The reversal of multidrug resistance in multicellular tumor spheroids by SDZ PSC 833.** *Anticancer Res* 1997, **17**:129-133.
38. Anderson M, Warr JR: **Expression of verapamil hypersensitivity in multidrug-resistant cells grown as multicellular spheroids.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1990, **26**:151-154.
39. Sakata K, Kwok TT, Gordon GR, Walch NS, Sutherland RM: **Resistance to verapamil sensitization of multidrug-resistant cells grown as multicellular spheroids.** *Int J Cancer* 1994, **59**:282-286.
40. Tunggal JK, Cowan DS, Shaikh H, Tannock IF: **Penetration of anti-cancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of hemotherapy for solid tumors.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**:1583-1586.
41. He L, Liu GQ: **Interaction of multidrug resistance reversal agents with P-glycoprotein ATPase activity on blood-brain barrier.** *Acta Pharmacol Sin* 2002, **23**:423-429.
42. Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R: **Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein.** *Mol Pharmacol* 2000, **58**:624-632.
43. Hicks KO, Ohms SJ, van Zijl PL, Denny WA, Hunter PJ, Wilson WR: **An experimental and mathematical model for the extravascular transport of DNA intercalator in tumours.** *Br J Cancer* 1997, **76**:894-903.
44. Cowan DSM, Hicks KO, Wilson WR: **Multicellular membranes as in vitro model for extravascular diffusion in tumours.** *Br J Cancer* 1996, **74**(Suppl XXVII):528s-531s.
45. Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M: **Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by hsp 90 beta.** *Anticancer Drugs* 1996, **7**:838-845.
46. Millward MJ, Cantwell BM, Munro NC, Robinson A, Corris PA, Harris AL: **Oral verapamil with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a randomised study.** *Br J Cancer* 1993, **67**:1031-1035.
47. Biswas EE: **Nucleotide binding domain I of the human retinal ABC transporter functions as a general ribonucleotidase.** *Biochemistry* 2001, **40**:8181-8187.
48. Gottesman MM: **Mechanisms of cancer resistance.** *Ann Rev Medicine* 2002, **53**:615-657.
49. Doyle LA, Ross DD: **Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP ABCG2.** *Oncogene* 2003, **22**:7340-7358.
50. Honjo Y, Hrycyna CA, Yan Q-W, Medina-Perez WY, Robery RW, van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE: **Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:6635-6639.
51. Oloumi A, MacPhail SH, Johnston PJ, Banath JP, Olive PL: **Changes in subcellular distribution of topoisomerase II alpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors.** *Cancer Res* 2000, **60**:5747-5753.
52. Luo C, Johnston PJ, MacPhail SH, Banath JP, Oloumi A, Olive PL: **Cell fusion studies to examine the mechanism for etoposide resistance in Chinese hamster V79 spheroids.** *Exp Cell Res* 1998, **243**:282-289.
53. Zhao R, Goldman ID: **Resistance to antifolates.** *Oncogene* 2003, **22**:7340-7358.
54. Scagliotti GV, Novello S, Salvaggi G: **Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer.** *Ann Oncol* 1999, **10**:S83-86.
55. Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A: **Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression.** *Respiration* 2003, **70**:32-35.
56. Volm M, Mattern J, Samsel B: **Overexpression of P-gp and glutathione S-transferase- π in resistant non-small cell lung carcinomas of smokers.** *Br J Cancer* 1991, **64**:700-704.
57. Oka M, Fukuda M, Sakamoto A, Takatani H, Fukuda M, Soda H, Kohno S: **The clinical role of MDR1 gene expression in human lung cancer.** *Anticancer Res* 1997, **17**:721-724.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

