



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE INHIBIDORES DE
P-GLICOPROTEÍNA SOBRE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR Y
EL EFECTO DE IMATINIB EN LA LÍNEA CELULAR HUMANA K562 DE
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

OMAR PRADO CARRILLO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ANDRÉS NAVARRETE CASTRO**

VOCAL: **Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**

SECRETARIO: **Profesor: PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO**

2° SUPLENTE: **Profesor: PAULINA DEL VALLE PÉREZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BÁSICA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

ASESOR DEL TEMA: **DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**

SUSTENTANTE: **OMAR PRADO CARRILLO**

ÍNDICE

ÍNDICE	III
LISTA DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	3
FISIOPATOLOGÍA.....	3
CLASIFICACIÓN	6
<i>Fase Crónica</i>	6
<i>Fase Acelerada</i>	7
<i>Fase Aguda</i>	7
TRATAMIENTO	8
MESILATO DE IMATINIB	10
RESISTENCIA A IMATINIB	13
P-GLICOPROTEÍNA	14
<i>Estructura de P-gp</i>	14
<i>Mecanismo de extrusión de fármacos</i>	15
<i>Sustratos de P-gp</i>	17
<i>Inhibición de P-gp</i>	18
INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA DE IMATINIB CON INHIBIDORES DE P-GP	20
<i>Ketoconazol</i>	21
<i>Mifepristona</i>	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
FÁRMACOS Y REACTIVOS	24
CULTIVO CELULAR.....	24
DESARROLLO DE LA LÍNEA CELULAR K562 RESISTENTE A IMATINIB	24
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	25
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE IMATINIB EN LAS LÍNEAS CELULARES K562 Y K562-RI	26
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE IMATINIB EN PRESENCIA DE KETOCONAZOL O MIFEPRISTONA EN LA LÍNEA CELULAR K562	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS	28
EFECTO DE IMATINIB EN LA LÍNEA K562.....	28
DESARROLLO DE RESISTENCIA A IMATINIB EN LA LÍNEA K562	28
EFECTO DE IMATINIB Y KETOCONAZOL EN LAS LÍNEAS K562 Y K562-RI	30
EFECTO DE IMATINIB Y MIFEPRISTONA EN LAS LÍNEAS K562 Y K562-RI	32

CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE IMATINIB EN LAS LÍNEAS K562 Y K562-RI	34
CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE IMATINIB EN LA LÍNEA K562 EN PRESENCIA DE KETOCONAZOL O MIFEPRISTONA	35
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

LMC	Leucemia Mieloide Crónica
Ph	Cromosoma Filadelfia
RNA	Ácido Ribonucleico
ITC	Inhibidor de Tirosina Kinasa
ATP	Trifosfato de Adenosina
IFN-α	Interferón alfa
TACT	Transplante Alogénico de Células Troncales
Ara-C	Arabinósido de Citosina
CYP	Citocromo P450
P-gp	P-glicoproteína
BCRP	Proteína de Resistencia a Cáncer de Mama
hOCT1	Transportador de Cationes Orgánicos 1
ABC	ATP Binding Cassette
MRP	Proteína Asociada a la Resistencia a Múltiples Fármacos
MDR	Resistencia a Múltiples Fármacos
TMD	Dominio Transmembrana
TMH	Alfa-Hélices Transmembrana
NBD	Dominio de Unión a Nucleótidos
ATCC	American Type Culture Collection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SFB	Suero Fetal Bovino

K562-RI	K562 Resistente a Imatinib
IM	Imatinib
K	Ketoconazol
MF	Mifepristona
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CI₅₀	Concentración Inhibitoria 50

INTRODUCCIÓN

Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) o Leucemia Granulocítica Crónica (LGC) se caracteriza por la proliferación descontrolada de leucocitos. Afecta a un individuo por cada 100 mil cada año, con una ligera preponderancia en hombres, y representa el 15% de todos los casos de leucemia en el hemisferio oeste.¹

Aproximadamente 95% de los pacientes con LMC presentan el fenotipo Filadelfia-positivo,² el cual se caracteriza por la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. El resultado es el acortamiento del cromosoma 22, denominado cromosoma Filadelfia (Ph).

La LMC puede evolucionar a través de tres fases, crónica, acelerada y blástica, cada una con su correspondiente aumento del recuento de blastos leucémicos y gravedad clínica.³ La historia natural de la enfermedad mantiene a la mayoría de los pacientes en fase crónica durante varios años antes de progresar a las fases acelerada y blástica, que resultan mortales.⁴

Fisiopatología

La LMC es un desorden clonal de células progenitoras pluripotenciales hematopoyéticas. Se caracteriza por la presencia de una oncoproteína constitutivamente activa producida por la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 referido como $t(9;22)(q34;q11)$ ⁵ (Figura 1).

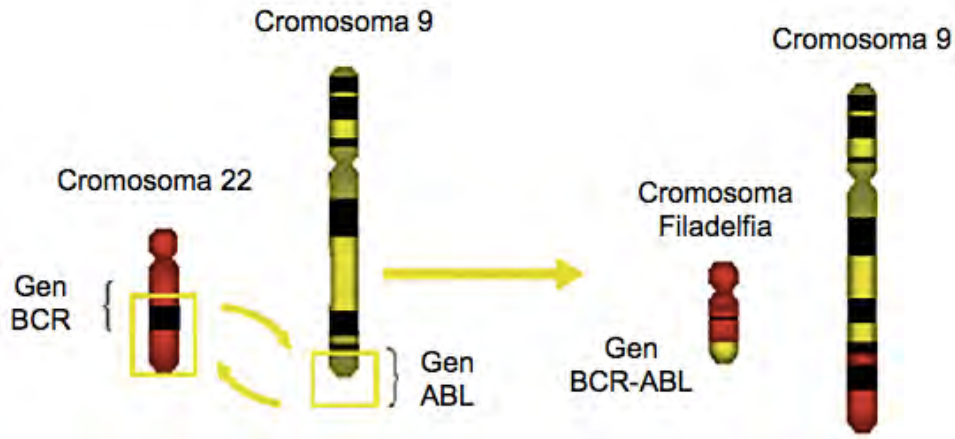


Figura 1. El cromosoma Filadelfia. La translocación recíproca t(9;22) origina la formación de un cromosoma 22 de menor tamaño conocido como cromosoma Filadelfia; esto conduce a la formación del gen de fusión BCR-ABL. [Imagen tomada de T. Leguay et al. / EMC – Hématologie 2 (2005) 187-205]

El cromosoma 22 anormal fue observado por primera vez en 1960 por Nowell y Hungerford⁶ en Filadelfia, EUA – de ahí su terminología común – pero la translocación recíproca con el cromosoma 9 no fue reconocida sino hasta 1973.⁷

Esta translocación cromosómica origina un rearrreglo génico entre el gen ABL, que normalmente está presente en el cromosoma 9, y el gen BCR, localizado en el cromosoma 22. Esto resulta en el gen de fusión BCR-ABL que constituye al equivalente molecular del cromosoma Ph.⁸ Este gen es transcrito en un RNA mensajero de 8.6 kb que codifica para una proteína con actividad enzimática, una tirosina cinasa (Figura 2).

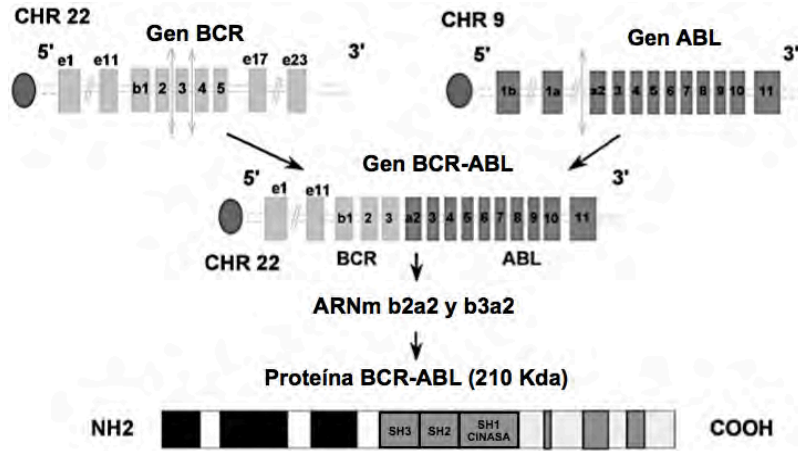


Figura 2. Gen de fusión BCR-ABL y su producto proteico. [Imagen tomada de F. Mahon et al / *Revue de Médecine Interne* 22 (2001) 894-899]

El gen ABL codifica para una tirosina cinasa no receptora que fosforila proteínas sustrato via su dominio SH1 y afecta funciones celulares cruciales, tales como proliferación incrementada, pérdida de la adhesión estromal y resistencia a la apoptosis.⁹ Sin embargo, el gen BCR-ABL bloquea la diferenciación celular y protege a la célula de la apoptosis para permitir la proliferación de células troncales no diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento.¹⁰ Esto es debido a la actividad intrínseca de la propia proteína ABL, amplificada por la yuxtaposición de la proteína BCR.¹¹

Al tener una actividad incrementada de tirosina cinasa, la proteína BCR-ABL puede fosforilar diversos sustratos y activar múltiples cascadas de transducción de señales intracelulares, afectando el crecimiento y la diferenciación celular, por lo que las células que la poseen, carecen del control del desarrollo celular normal y se tornan leucémicas.¹²

El gen BCR-ABL se encuentra presente en todos los casos de LMC y resulta en dos puntos críticos de la enfermedad. Primero, el gen proporciona un biomarcador

único para el diagnóstico y el monitoreo de la respuesta al tratamiento, y segundo, la tirosina cinasa de fusión es susceptible a la acción de fármacos. Los inhibidores de tirosina cinasa (ITC) bloquean la unión de ATP al dominio cinasa de ABL, inhibiendo la fosforilación y provocando la muerte celular.⁴

Clasificación

La historia natural de la LMC se caracteriza por tener tres fases de desarrollo: la fase crónica, la fase acelerada y la fase aguda.¹³ Las células progenitoras de la LMC están sometidas a una proliferación excesiva durante la fase crónica. Estas células aún conservan la capacidad para diferenciarse y funcionar normalmente, por lo que en esta etapa los síntomas pueden ser controlados fácilmente. Sin embargo, sin una intervención médica efectiva, la enfermedad puede avanzar a través de un período de inestabilidad progresiva hacia la fase acelerada, y posteriormente hasta una transformación terminal de leucemia aguda, también conocida como crisis blástica, en la cual la diferenciación se detiene, generando la acumulación de células progenitoras de LMC no diferenciadas en médula ósea y en sangre periférica.^{14,15}

Fase Crónica

La LMC se presenta con más frecuencia alrededor de los 50 a 60 años, es poco frecuente en menores de 20 años (menos de 10%). Alrededor de 80% de los casos se diagnostican durante la fase crónica y hasta el 40% de los pacientes puede ser asintomáticos en el momento del diagnóstico. Esta etapa dura de 35 a 65 meses sin tratamiento, y alrededor de seis meses cuando se trata con

quimioterapia convencional. Aproximadamente dos tercios de los pacientes van a progresar a la fase acelerada.

En general, las anormalidades de laboratorio se descubren antes de que los síntomas se hagan evidentes y éstos sólo se desarrollan cuando los leucocitos están claramente elevados (30 000 a 90 000). Cuando los síntomas están presentes, incluyen fatiga, sudores nocturnos, pérdida de peso, o manifestaciones de esplenomegalia, tales como malestar abdominal en el cuadrante superior izquierdo, saciedad temprana, o anorexia. La citología hemática muestra anemia leve y la disminución de la hemoglobina inversamente proporcional al incremento en los leucocitos. La leucocitosis es frecuentemente mayor a 200 000/ μ L.

Fase Acelerada

Esta fase se puede presentar de 4 a 6 años después del inicio de la enfermedad. El promedio de supervivencia para los pacientes en fase acelerada es de 1 a 2 años.² La citología hemática confirma una mayor anemia y un aumento en el número de basófilos y, en menor proporción, de blastos. La historia natural de la enfermedad puede ser afectada por una terapia eficaz que conduzca a la eliminación del cromosoma Ph.

Fase Aguda

La mayoría de los pacientes finalmente alcanzan la fase final del padecimiento, a menos que la enfermedad sea suprimida de manera efectiva antes de llegar a esta etapa. El promedio de supervivencia de los pacientes en la fase aguda es de 3 a 12 meses. Esta fase se caracteriza por la presencia de más del 30% de

blastos en sangre o en médula ósea periférica. La transformación ocurre principalmente por células de origen mieloide en 50% de los pacientes, de origen linfoide en 25%, y el resto por células de origen indiferenciado.¹³

Tratamiento

Los cambios más relevantes en el desarrollo del tratamiento de la LMC han ocurrido a partir de la segunda mitad del siglo XX y han influido significativamente en su curso clínico y en su pronóstico.

Actualmente se acepta que los niveles de respuesta al tratamiento en LMC son:

- a) Respuesta hematológica
- b) Respuesta citogenética mínima, menor, mayor y completa
- c) Respuesta molecular

Esta clasificación está relacionada con los criterios de respuesta a largo plazo y con el tiempo de curación. Dado que la marca molecular es el gen de fusión BCR-ABL, su desaparición es el principal objetivo.

En 1953, el busulfán, un agente alquilante, fue el primer fármaco citotóxico que logró el control hematológico efectivo en LMC. Sin embargo, el busulfán no siempre normalizaba la cuenta sanguínea y, más importante, podía inducir la crisis blástica debido a su toxicidad y la casi nula posibilidad de lograr alguna forma de respuesta citogenética.¹⁶

En 1966, la hidroxiurea, otro agente alquilante con menor toxicidad, fue indicada para el tratamiento y logró restaurar rápidamente la cuenta hemática, aunque la

respuesta citogenética fue rara. En 1993, demostró ocasionar mayor supervivencia que el busulfán (58 meses vs 45 meses).¹⁷ Desafortunadamente, el busulfán y la hidroxiurea no son capaces de inducir remisión citogenética, por lo que actualmente se les considera como terapias paliativas.

Años más tarde, dos estrategias de tratamiento completamente distintas el interferón alfa (IFN- α) y el trasplante alogénico de células troncales (TACT), mostraron no solamente la desaparición del cromosoma Ph, sino también su relación con una supervivencia prolongada.¹⁸

En 1994 se reportó la superioridad terapéutica del IFN- α , respecto al busulfán y la hidroxiurea.¹⁹ El IFN- α indujo la remisión citogenética completa en alrededor del 15% de los pacientes,²⁰ así como la supervivencia de los mismos (66% a 5 años).²¹ Sin embargo, el IFN- α está acompañado de diversos efectos adversos que interfieren con la calidad de vida del paciente, por lo que el tratamiento a largo plazo resulta imposible en la mayoría de los casos. La adición de arabinósido de citosina (Ara-C) al IFN- α resultó en mayor incidencia de la respuesta citogenética y mayor supervivencia de los pacientes, pero también se incrementó la toxicidad en 26%, lo que favoreció una alta frecuencia de abandono al tratamiento.²²

A partir de 1996 el TACT demostró utilidad terapéutica potencialmente curativa,²³ particularmente en pacientes en fase crónica temprana y menores de 45 años.²⁴ Fue descrito por primera vez en el contexto de donadores singénicos,²⁵ y después entre hermanos²⁶ y donadores voluntarios no emparentados.²⁷

El TACT ofrece la posibilidad de curación en 40 a 60% de los pacientes que son sometidos al procedimiento. Esta es la terapia más efectiva en cuanto a la

producción de remisión molecular de la enfermedad.²⁸ Desafortunadamente, la mortalidad relacionada con el trasplante oscila entre 5 y 50%, restringiendo el procedimiento a pacientes jóvenes y a aquellos cuyos donadores tuvieran antígenos leucocitarios humanos completamente compatibles. La tasa de supervivencia libre de enfermedad en pacientes transplantados en fase crónica es de 40 a 80%, 15 a 40% en fase acelerada y 5 a 20% en fase blástica. Estos resultados se han reproducido en México, en donde se ha encontrado que la supervivencia libre de enfermedad a 5 años es del 55%.²⁹

El TACT llegó a ser la primera línea de tratamiento para todos los pacientes elegibles que se encontraran en fase crónica y en fase acelerada temprana.¹ No obstante, se convirtió en la tercera o cuarta línea de tratamiento para pacientes con LMC, dado que la terapia con ITC, como imatinib, resulta preferible.

Mesilato de Imatinib

En 1996, Druker y colaboradores³⁰ reportaron por primera vez los efectos *in vitro* de un inhibidor específico de la tirosina cinasa BCR-ABL, entonces conocido como inhibidor de transducción de señales 571 (STI571), sobre líneas celulares de LMC (Figura 3).

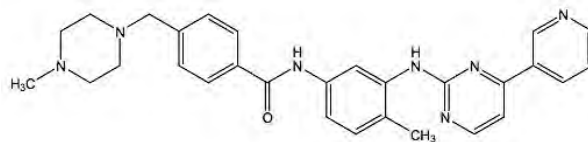


Figura 3. Estructura química del imatinib.

En un estudio de fase 1 de una etapa avanzada de la enfermedad, STI571, ahora conocido como imatinib (Gleevec[®]), no solamente controló la cuenta sanguínea y restauró la fase crónica, sino que 95% de los pacientes lograron una respuesta hematológica completa y 60% una respuesta citogenética mayor, por lo que se constituyó como la primera línea de tratamiento para este padecimiento.^{14,15}

Imatinib obtuvo la aprobación acelerada por la FDA en 2001 debido a su excepcional eficacia y toxicidad mínima, aunque el período de seguimiento disponible era corto.³¹ En los primeros ensayos clínicos, los efectos adversos más comunes fueron la mielosupresión, calambres, náuseas, fatiga, diarrea, edema y dolor muscular.³²

Imatinib ocupa el sitio de unión a ATP dentro de la proteína BCR-ABL, lo que origina un cambio conformacional en la estructura cuaternaria de la tirosina cinasa, inhibiendo la autofosforilación y la fosforilación de residuos de tirosina en sustratos proteicos (Figura 4). De esta manera, imatinib previene la transducción de señales cruciales para la patogénesis y la proliferación celular de líneas BCR-ABL positivas.

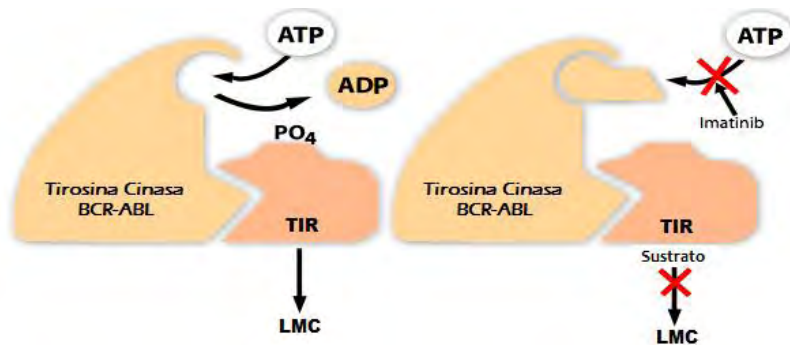


Figura 4. Mecanismo de acción de imatinib. Imatinib interfiere con la unión de ATP a BCR-ABL, impidiendo la señalización que favorece los mecanismos que desencadenan LMC. Abreviaturas: ADP: Difosfato de Adenosina; ATP: Trifosfato de Adenosina; LMC: Leucemia Mieloide Crónica; TIR: Tirosina; PO₄: Fosfato. [Imagen tomada de P. Treuil / Actualités Pharmaceutiques 473 (2008) 25-30]

Imatinib tiene una biodisponibilidad de alrededor del 92% (86%-99%) en voluntarios sanos, con vida media plasmática de $13,5 \pm 0,9$ horas.³³ Los ITCs son extensamente metabolizados por las enzimas del citocromo P450 (CYP), cuyas funciones están caracterizadas por un alto grado de variabilidad interindividual.³⁴ El imatinib es un sustrato de CYP3A4 y un inhibidor de otras enzimas, tales como CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4/5.^{35,36}

Algunos ITC son también sustratos de los transportadores de fármacos P-glicoproteína (P-gp), la Proteína de Resistencia a Cáncer de Mama (BCRP) y el Transportador de Cationes Orgánicos 1 (hOCT1).³⁷⁻⁴⁰

La LMC en fase crónica desarrolla resistencia a imatinib después de largos períodos de tratamiento, por lo que los pacientes en fase acelerada o en crisis blástica podrían volverse completamente resistentes.⁴¹⁻⁴³ Esto es debido a varios mecanismos, tales como la amplificación del gen BCR-ABL,⁴⁴ la baja absorción del fármaco o por mutaciones puntuales en la secuencia de la oncoproteína.⁴⁵

Resistencia a imatinib

Actualmente se han descrito varios mecanismos de resistencia a los ITC, que pueden ser divididos en mecanismos dependientes e independientes de la proteína de fusión BCR-ABL. Los mecanismos dependientes de BCR-ABL incluyen mutaciones y amplificación del gen; los mecanismos independientes de BCR-ABL incluyen eflujo de fármacos mediado por transportadores del complejo de unión a ATP (ABC), microentorno que facilita la resistencia y reparación de bases por escisión deficiente para detectar anomalías cromosómicas.⁴⁶

Los transportadores ABC son proteínas de membrana ubicuas que pueden generar energía a partir de la hidrólisis de ATP para transportar compuestos a través de las membranas biológicas (membrana plasmática, así como las membranas intracelulares del retículo endoplásmico, peroxisomas y mitocondrias) en contra de sus gradientes de concentración, lo que limita la acumulación celular de dichos sustratos.⁴⁷

La sobreexpresión de los transportadores confiere resistencia cruzada a múltiples fármacos a través de la expulsión constante de compuestos citotóxicos. Se han encontrado varios miembros de la familia de proteínas ABC responsables de la resistencia a inhibidores de BCR-ABL.^{48,49}

Entre los miembros de la superfamilia de transportadores ABC que son relevantes en la eficacia y toxicidad de fármacos se encuentran P-gp, BCRP, y la familia de transportadores de la Proteína Asociada a la Resistencia a Múltiples Fármacos (MRP).⁵⁰

P-glicoproteína

El fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) es considerada una de las principales causas de fallo en la quimioterapia del cáncer, pero también provee funciones fisiológicas importantes.

P-gp, el producto del gen MDR1, es un transportador ABC localizado en la membrana plasmática, donde puede transportar una gran variedad de compuestos estructuralmente diversos hacia el exterior de la célula. Esto resulta en una disminución de la acumulación intracelular y en un aumento de la resistencia a agentes citotóxicos, por lo que se encuentra entre los factores de pronóstico más relevantes en LMC.⁵¹

Se expresa constitutivamente en tejidos epiteliales humanos normales y, debido a su amplia especificidad de sustrato, a su expresión celular polarizada en muchos tejidos excretores y de barrera, y a su gran capacidad de extrusión, puede desempeñar un papel crucial en la limitación de la absorción y la distribución de xenobióticos nocivos.

Estructura de P-gp

Los transportadores ABC contienen típicamente un par de dominios de unión a ATP que se encuentra en el citoplasma, y dos juegos de dominios transmembrana (TMD), normalmente contienen seis alfa-hélices que abarcan la membrana.⁵² P-gp es un único polipéptido 170 kDa⁵³ que consta de 1280 aminoácidos organizados en dos repeticiones en tándem de 610 aminoácidos unidos por una región de aproximadamente 60 aminoácidos.⁵⁴ La proteína parece haber surgido por un

evento de duplicación de genes, mediante la fusión de dos mitades homólogas, cada una de las cuales consta de seis alfa-hélices transmembrana altamente hidrófobas (TMH) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD) situados en el lado citoplásmico de la membrana, que se une e hidroliza ATP (Figura 5).^{55,56} Las dos medias moléculas están separadas por una “región de unión” citoplásmica altamente cargada y fosforilada en varios sitios por la proteína cinasa C.⁵⁷ Los TMH forman la vía a través de la que los compuestos atraviesan la membrana.

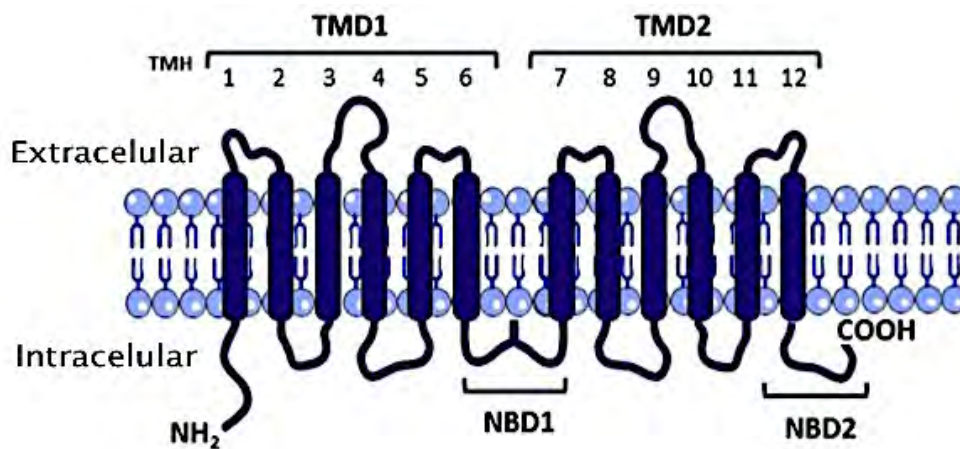


Figura 5. Modelo bidimensional de P-gp. Se muestran las dos mitades homólogas, cada una con seis TMH y un NBD situados en el lado citoplásmico. Los 12 segmentos transmembranales se pliegan para formar una estructura tridimensional con forma de barril en la membrana. [Imagen tomada de R. Silva et al. / *Pharmacology & Therapeutics* 149 (2015) 1-123]

Mecanismo de extrusión de fármacos

El mecanismo exacto por el cual P-gp combina la hidrólisis de ATP con el transporte de fármacos a través de la membrana plasmática, así como el sitio exacto en el que el sustrato interactúa con la proteína, no han sido esclarecidos completamente. Sin embargo, los tres modelos prevalentes: modelo de poro, modelo de *flipasa* y modelo de aspirador hidrófobo, explican el mecanismo de

eflujo (Figura 6). La unión y la hidrólisis de ATP es esencial para el funcionamiento de P-gp, en donde el transporte de una molécula de fármaco ocurre a expensas de dos moléculas de ATP.⁵⁸

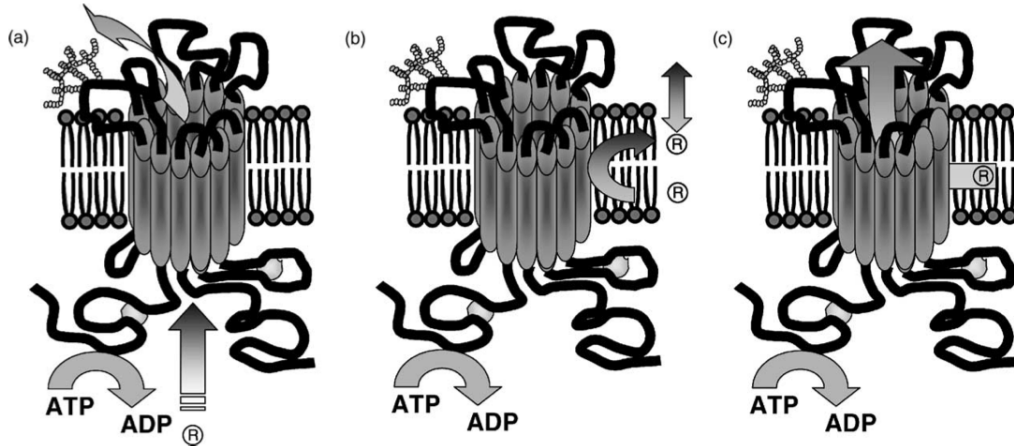


Figura 6. Modelos propuestos para el mecanismo de eflujo de fármacos por P-gp. (a) Modelo de poro, (b) Modelo de *flipasa* y (c) Modelo de aspirador hidrófobo. En el modelo de poro, los fármacos se asocian con P-gp en el compartimento citosólico y son transportados fuera de la célula a través de un canal de proteínas. En el modelo *flipasa*, los fármacos embebidos en la cara interna de la membrana plasmática, se unen a P-gp y son translocados a la cara externa de la bicapa, desde la cual difunden pasivamente al medio extracelular. En el modelo de aspirador hidrófobo se combinan las características de los modelos anteriores. [Imagen tomada de R. Varma et al. / *Pharmacological Research* 48 (2003) 347-359]

En general, se asume que los sustratos de P-gp son translocados o invertidos desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática o bien hacia el medio extracelular directamente.⁵⁹ Esta acción origina que la concentración de fármaco sea más alta en la fase acuosa externa.⁶⁰ Es importante destacar que el transportador es capaz de interceptar los sustratos antes de que entren en el citosol, lo que protege a la célula de la exposición a moléculas potencialmente tóxicas.

Sustratos de P-gp

P-gp puede transportar un vasto repertorio de compuestos fuera de la célula, los cuales son química, estructural y farmacológicamente distintos, e incluyen productos naturales, fármacos quimioterapéuticos, bloqueadores de canales de calcio, esteroides, péptidos, inmunosupresores, entre otros (Tabla 1).⁶¹ La mayoría de estos sustratos son débilmente anfipáticos y relativamente hidrófobos, poseen a menudo anillos aromáticos y átomos de nitrógeno positivamente cargados.⁶⁰

Tabla 1. Diferentes clases de sustratos de P-gp conocidos.

Clase	Ejemplos
Analgésicos opioides	Morfina, fentanilo
Antiarrítmicos	Verapamilo, quinidina, digoxina
Antidepresivos	Amitriptilina, nortriptilina
Antiepilépticos	Fenitoína, carbamazepina, fenobarbital
Antihistamínicos	Terfenadina, fexofenadina
Antihipertensivos	Reserpina, losartán, prazosina
Antineoplásicos	Antibióticos: antraciclinas (doxorubicina), actinomicinas Antimetabolitos: metotrexano, citarabina, hidroxiurea Taxanos: paclitaxel, docetaxel Alcaloides de la vinca: vincristina, vinblastina Agentes alquilantes: cisplatino Inhibidores de tirosina cinasa: imatinib
Inmunosupresores	Ciclosporina, tacrolimus
Neurolépticos	Clorpromazina, fenotiazina
Productos naturales	Flavonoides, curcuminoides

Información recopilada de R. Silva et al. / Pharmacology & Therapeutics 149 (2015) 1-123

Dada su importancia en la resistencia a fármacos, se ha comenzado a estudiar la interacción entre esta proteína y sus sustratos más relevantes, entre los que se encuentran los ITC, principalmente imatinib.⁶²⁻⁶⁴

Inhibición de P-gp

La MDR ha sido definida como un fenómeno por el cual las células cancerosas que han sido expuestas a un tipo de fármaco desarrollan resistencia cruzada a otros fármacos que son estructural y funcionalmente distintos.⁶⁵ Uno de los mecanismos de mayor relevancia en el proceso de MDR es la inducción de P-gp.

Es por ello que entre los mecanismos de reversión MDR, la inhibición directa de P-gp es uno de los más estudiados, demostrado por primera vez en 1981.⁶⁶ Desde entonces, el uso terapéutico de inhibidores de P-gp para mejorar la biodisponibilidad y la eficacia de fármacos ha ganado un interés considerable.

Un inhibidor de P-gp puede actuar bloqueando el sitio de unión del sustrato, ya sea competitiva, no competitiva o alostéricamente; interfiriendo con la hidrólisis de ATP,⁶⁷ o alterando la integridad de los lípidos de la membrana celular.⁶⁸ Existen muchos fármacos que actúan como inhibidores de P-gp, algunos de los cuales se utilizan como agentes terapéuticos para otras indicaciones clínicas (Tabla 2).

Tabla 2. Inhibidores de P-gp conocidos.

Clase	Ejemplos
Analgésicos	Meperidina, pentazocina
Anestésicos	Cloroformo, propofol
Antibióticos	Ceftriaxona, eritromicina, azitromicina, claritromicina
Antifúngicos	Itraconazol, ketoconazol
Antihipertensivos	Reserpina, prazosina
Antihistamínicos	Terfenadina, benzquinamida
Antiinflamatorios	Indometacina, ibuprofeno
Antidepresivos	Paroxetina, fluoxetina
Antineoplásicos	Tamoxifen, vinblastina, gefitinib
Antivirales	Ritonavir, nelfinavir, saquinavir
Estimulantes de SNC	Cafeína, nicotina
Hormonas esteroideas	Progesterona, cortisol, metilprednisolona, mifepristona
Inmunosupresores	Ciclosporina, tacrolimus
Neurolépticos	Clorpromazina, haloperidol
Productos naturales	Flavonoides, alcaloides, cumarinas, cannabinoides

Información recopilada de R. Silva et al. / *Pharmacology & Therapeutics* 149 (2015) 1-123

Los inhibidores de primera generación son compuestos farmacológicamente activos que ya estaban en uso clínico y que más tarde mostraron la capacidad de inhibir a P-gp. La mayoría de estos bloqueadores son en sí mismos sustratos de P-gp, lo que sugiere que inhiben a la proteína de manera competitiva.⁶⁶ Sin embargo, el uso clínico de estos compuestos está limitado por su toxicidad, ya que alcanzan altas concentraciones séricas con la dosis requerida para la inhibición de P-gp.⁶⁹

Varios estudios han demostrado el posible uso de inhibidores de P-gp para revertir el fenotipo MDR en un intento por mejorar la eficiencia de los agentes quimioterapéuticos y perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de una gran variedad de moléculas.

Interacción farmacológica de imatinib con inhibidores de P-gp

Las interacciones farmacológicas mediadas por P-gp son difíciles de distinguir de aquellas mediadas por CYP3A4, por lo que deben ser consideradas al administrar sus sustratos en combinación con Imatinib. La inhibición de CYP3A4 conduce a una reducción del metabolismo de primer paso y a una reducción de la velocidad de eliminación. Asimismo, la inhibición de P-gp modifica la expulsión de fármacos a la luz intestinal aumentando su absorción.

Se ha reportado que en voluntarios sanos la administración concomitante de imatinib con inhibidores duales de CYP3A4 y P-gp, como verapamilo, eritromicina, ciclosporina, y ketoconazol, entre otros, incrementa la concentración plasmática del fármaco al bloquear su metabolismo y su extrusión celular.⁷⁰ La inhibición lograda con ketoconazol produce un aumento del 40% en la biodisponibilidad de imatinib.⁷¹

Los estudios *in vitro* sugieren que ketoconazol es un excelente inhibidor de P-gp dada la reversión de la resistencia en una línea celular de cáncer cervical con fenotipo MDR.⁷² Sin embargo, se desconoce la interacción de imatinib y ketoconazol y si ésta podría modificar la eficacia de imatinib.

Dados los antecedentes descritos anteriormente, en el presente trabajo se evaluaron dos agentes inhibidores de P-gp, ketoconazol y mifepristona, sobre el efecto de imatinib.

Ketoconazol

El ketoconazol es un antifúngico imidazólico indicado para el tratamiento de diversas infecciones micóticas (Figura 7). No existe en forma inyectable a pesar de que su absorción por vía oral es muy variable. Se une fuertemente a proteínas plasmáticas (84%) y su volumen de distribución es de alrededor de 1 L/Kg. Es metabolizado a nivel hepático por CYP3A4, su eliminación se lleva a cabo mayoritariamente por vía biliar y la excreción urinaria no sobrepasa el 15%. Tiene una vida media de 8 horas.

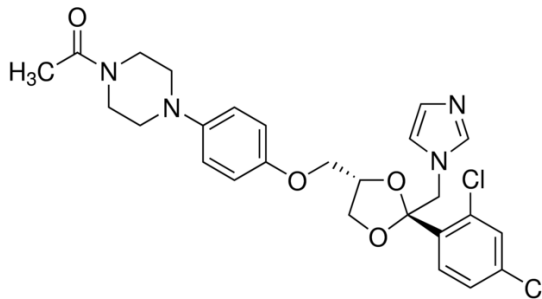


Figura 7. Estructura química del ketoconazol.

Mifepristona

La mifepristona es un compuesto esteroideo sintético, antagonista competitivo de los receptores de cortisol (Figura 8). También es antagonista competitivo de los receptores de progesterona y debido a su potente efecto tiene relevancia clínica para la interrupción del embarazo, la contracepción de emergencia y la regulación del ciclo menstrual.⁷³ Se une fuertemente a los receptores de progesterona en endometrio, mínimamente a los receptores de estrógeno, e incluso regula los receptores de andrógenos.⁷⁴

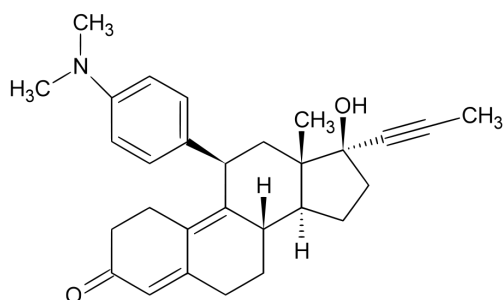


Figura 8. Estructura química de la mifepristona.

Además de su uso como agente contraceptivo, también posee efectos antiproliferativos,⁷⁵ y se asocia con el arresto del crecimiento celular⁷⁶ y con la reducción de los marcadores de proliferación en tumores dependientes e independientes de hormonas.⁷⁷

Adicionalmente se ha demostrado que mifepristona inhibe la expresión de P-gp en células de cáncer gástrico, revirtiendo la resistencia de fármacos antineoplásicos como doxorubicina, paclitaxel, entre otros, incrementando su efecto antiproliferativo.

HIPÓTESIS

Los inhibidores de P-gp, ketoconazol y mifepristona, incrementarán el efecto antiproliferativo y la concentración intracelular de imatinib en la línea K562 de leucemia mieloide crónica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de ketoconazol y mifepristona, inhibidores de P-gp, sobre el efecto antiproliferativo y la concentración intracelular de imatinib en la línea K562 de LMC.

Objetivos Particulares

1. Generar una línea celular resistente a Imatinib a partir de la línea K562 y determinar su resistencia relativa.
2. Determinar la concentración intracelular de imatinib en la línea celular K562 sensible y resistente a imatinib.
3. Evaluar la influencia de ketoconazol y mifepristona sobre el efecto antiproliferativo de imatinib en la línea celular K562 sensible y resistente.
4. Determinar la concentración intracelular de imatinib en presencia de ketoconazol o mifepristona en la línea celular K562.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fármacos y reactivos

El imatinib, el ketoconazol y la mifepristona fueron obtenidos de Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). El imatinib es reconstituido con solución salina estéril y ketoconazol y mifepristona se reconstituyen con etanol absoluto. Todos los reactivos se mantienen en condiciones de esterilidad a -20 °C.

Cultivo celular

La línea celular K562 de LMC (ATCC; American Type Culture Collection, Rockville, USA) se mantuvo en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, NY, USA) en condiciones de esterilidad, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire.

Desarrollo de la línea celular K562 resistente a imatinib

La generación de la línea celular K562 resistente a imatinib (K562-RI) se basó en una estrategia de exposición continua a concentraciones crecientes de imatinib. La concentración inicial de Imatinib fue de 1 nM y se incrementó cada semana. Después de ocho meses, el fenotipo resistente fue confirmado y el cultivo celular fue mantenido bajo una exposición continua de 250 nM de Imatinib. Por otro lado, el cultivo celular parental fue mantenido sin imatinib como referencia.

Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo con 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazolio de sodio (XTT, Roche Diagnostics). En placas de 96 pozos se incubaron 12 000 células en un volumen final de 150 μ L de DMEM por cada pozo. El grupo control fue expuesto a concentraciones crecientes de imatinib únicamente (IM). Los otros grupos fueron expuestos a imatinib con ketoconazol (IM + K) e imatinib con mifepristona (IM + MF) durante 72 h (Tabla 3).

Tabla 3. Esquema de exposición de fármacos para la determinación de la proliferación celular.

Línea Celular	Grupo	Fármacos	Concentraciones
K562	IM	Imatinib	0 – 2500 nM
	IM + K	Imatinib	0 – 2500 nM
		Ketoconazol	0, 0.1, 1.0, 10 μ M
	IM + MF	Imatinib	0 – 2500 nM
Mifepristona		0, 10, 20 μ M	
K562-RI	IM	Imatinib	100 – 10 000 nM
	IM + K	Imatinib	100 – 10 000 nM
		Ketoconazol	0, 0.1, 1.0, 10 μ M
	IM + MF	Imatinib	100 – 10 000 nM
Mifepristona		0, 10, 20 μ M	

Después del período de incubación se agregaron 20 μ L de XTT a cada pozo y se incubaron nuevamente durante 3 h a 37 °C. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 492 nm con un espectrofotómetro de barrido (lector de ELISA; Thermo Scientific) y los resultados de absorbancia se expresaron como porcentaje de proliferación celular. Los datos se ajustan a una función sigmoideal para

caracterizar la relación concentración-respuesta de cada fármaco cuando se agregan al medio solos y combinados.

Determinación de la concentración intracelular de imatinib en las líneas celulares K562 y K562-RI

Se sembraron 2×10^6 células de cada línea celular, K562 y K562-RI, en cajas de cultivo de 25 cm². Ambos grupos fueron expuestos a una concentración de 5 µg/mL de imatinib durante 3 h.

Después del período de exposición, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS para eliminar el fármaco extracelular. Posteriormente se realizó el proceso de extracción del imatinib intracelular, utilizando cloruro de metileno. La fase orgánica fue separada y evaporada bajo corriente de nitrógeno. Los residuos fueron reconstituidos con fase móvil, compuesta por una mezcla de Trietilamina y Acetonitrilo, y mezclados con vórtex durante 2 minutos. Se tomaron 100 µL para ser inyectados al sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Las condiciones cromatográficas para la determinación de imatinib fueron las siguientes: un equipo de HPLC (Waters 2695), una columna C-8 (Symmetry) a una temperatura de 26 °C, y fase móvil con flujo de 1.5 mL/min. La detección fue realizada a 254 nm.

Determinación de la concentración intracelular de imatinib en presencia de ketoconazol o mifepristona en la línea celular K562

Ambas líneas celulares, K562 y K562-RI, fueron expuestas a diferentes combinaciones de fármacos: a) Imatinib (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 h; b) Imatinib y Ketoconazol (10 μM) y c) Imatinib + Mifepristona (20 μM). La exposición a ketoconazol y mifepristona se realizó 4 horas previas a la exposición a imatinib (Tabla 4).

Tabla 4. Esquema de exposición a fármacos para la determinación de la concentración intracelular en la línea K562 en presencia de ketoconazol y mifepristona.

Línea Celular	Grupo	Pre-incubación (4 h)	Exposición a Imatinib (3 h)
K562	IM	Sin fármaco	Imatinib 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	IM + K	Ketoconazol 10 μM	Imatinib 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	IM + MF	Mifepristona 20 μM	Imatinib 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Para la cuantificación de imatinib intracelular en combinación con ketoconazol o mifepristona se siguió el procedimiento de extracción descrito anteriormente.

Análisis Estadístico

Los resultados se reportan como el promedio \pm error estándar de la media. Se realizó la prueba t de Student con el programa GraphPad Prism. Un valor $p < 0.05$ indicó diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Efecto de imatinib en la línea K562

La Figura 9 muestra la disminución de la proliferación celular en función de la concentración de imatinib en la línea K562. Se observó un efecto dependiente de la concentración, teniendo una ligera mejor respuesta después de 72 horas de exposición. El tiempo de exposición (72 h) para los siguientes ensayos fue establecido a partir de estos resultados..

Desarrollo de resistencia a imatinib en la línea K562

Para generar resistencia a imatinib las células fueron expuestas a una concentración inicial de 1 nM, la cual fue incrementada semanalmente hasta alcanzar una concentración de 250 nM. Después de 8 meses de exposición se logró obtener una clona con fenotipo resistente al fármaco. Esto fue confirmado con la evaluación de la proliferación celular después de la exposición a imatinib en ambas clonas celulares, sensible (K562) y resistente (K562-RI).

Se observó una separación entre las curvas de ambas clonas debido a un menor efecto de imatinib sobre la proliferación celular de K562-RI (Figura 10). A partir de estos resultados se determinó la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de imatinib en ambas clonas celulares, así como la resistencia relativa (Tabla 5).

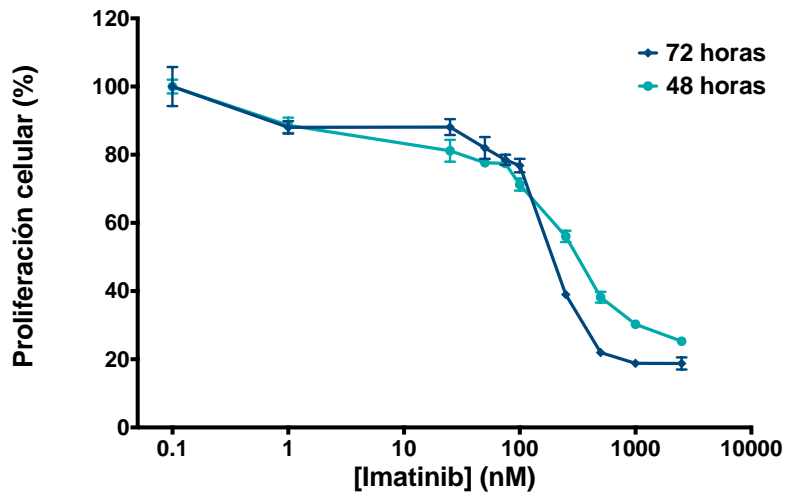


Figura 9. Proliferación de la línea K562 después de la exposición a imatinib durante 48 y 72h. Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E. *diferencia estadísticamente significativa.

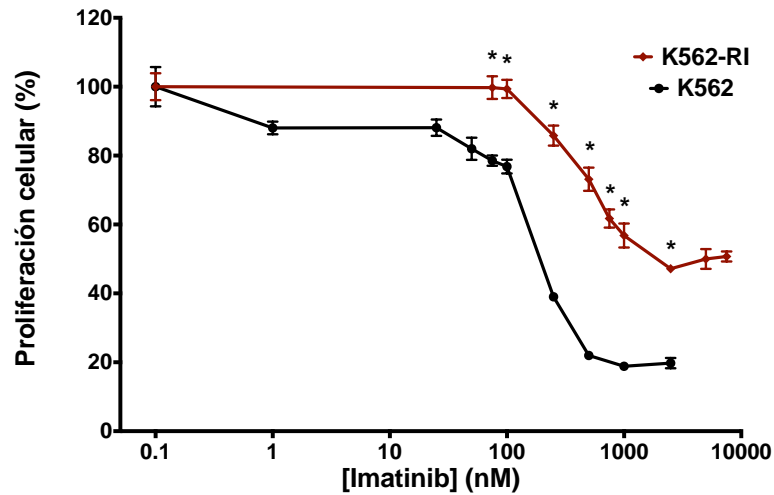


Figura 10. Proliferación de las líneas K562 y K562-RI después de la exposición a imatinib durante 72 h. Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E. *diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 5. CI_{50} de imatinib en las líneas K562 y K562-RI.

CI_{50} (nM)		Resistencia Relativa
K562	K562-RI	
208.4 \pm 3.255	2217 \pm 136.7	10.64

Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. La resistencia relativa fue obtenida al dividir el valor de CI_{50} de K562-RI entre el valor de CI_{50} de K562 para cada tratamiento.

Efecto de imatinib y ketoconazol en las líneas K562 y K562-RI

La proliferación celular de ambos fenotipos celulares en presencia de imatinib y ketoconazol (0, 0.1, 1.0 y 10 μM) se muestra en la Figura 11. El ketoconazol aumentó ligeramente el efecto de imatinib en la línea parental (A). Sin embargo, la clona resistente presentó una mayor inhibición de la proliferación cuando se combinó imatinib con ketoconazol 10 μM (B).

A partir de las curvas de proliferación se determinaron los valores de la CI_{50} de imatinib en combinación con ketoconazol (Tabla 6). Con base en los valores obtenidos se puede observar que ketoconazol (10 μM) fue capaz de disminuir la CI_{50} de imatinib en 1.5 veces en la línea parental, mientras que para la línea resistente fue mayor, aproximadamente 7.5 veces.

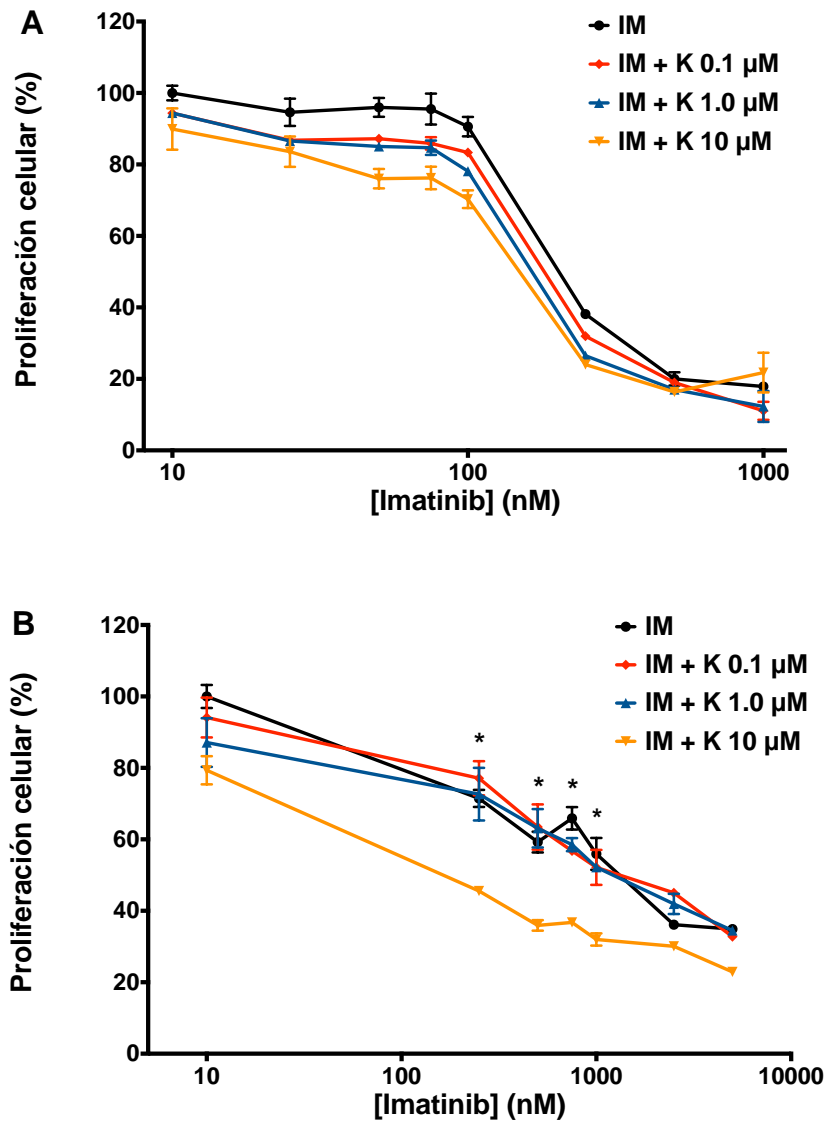


Figura 11. Proliferación de las líneas K562 (A) y K562-RI (B) después de la exposición a imatinib en combinación con ketoconazol durante 72 h. Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E. *diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de imatinib solo e imatinib con ketoconazol 10 μ M.

Tabla 6. CI_{50} de imatinib en las líneas K562 y K562-RI expuestas a ketoconazol.

Ketoconazol (μ M)	CI_{50} (nM)	
	K562	K562-RI
0	210	1360
0.1	192	1310
1.0	170	1230
10.0	138	178

Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E.

Efecto de imatinib y mifepristona en las líneas K562 y K562-RI

De la misma manera, se evaluó la proliferación de ambas líneas celulares expuestas a imatinib con mifepristona (0, 10 y 20 μM). Los resultados demostraron que mifepristona modificó la proliferación de ambas clonas (Figura 12). A diferencia de ketoconazol, mifepristona (20 μM) mostró mayor efecto sobre la línea parental que sobre la línea resistente. El valor de la CI_{50} de imatinib disminuyó aproximadamente 13 veces en la línea parental, mientras que en línea resistente disminuyó 2 veces (Tabla 7).

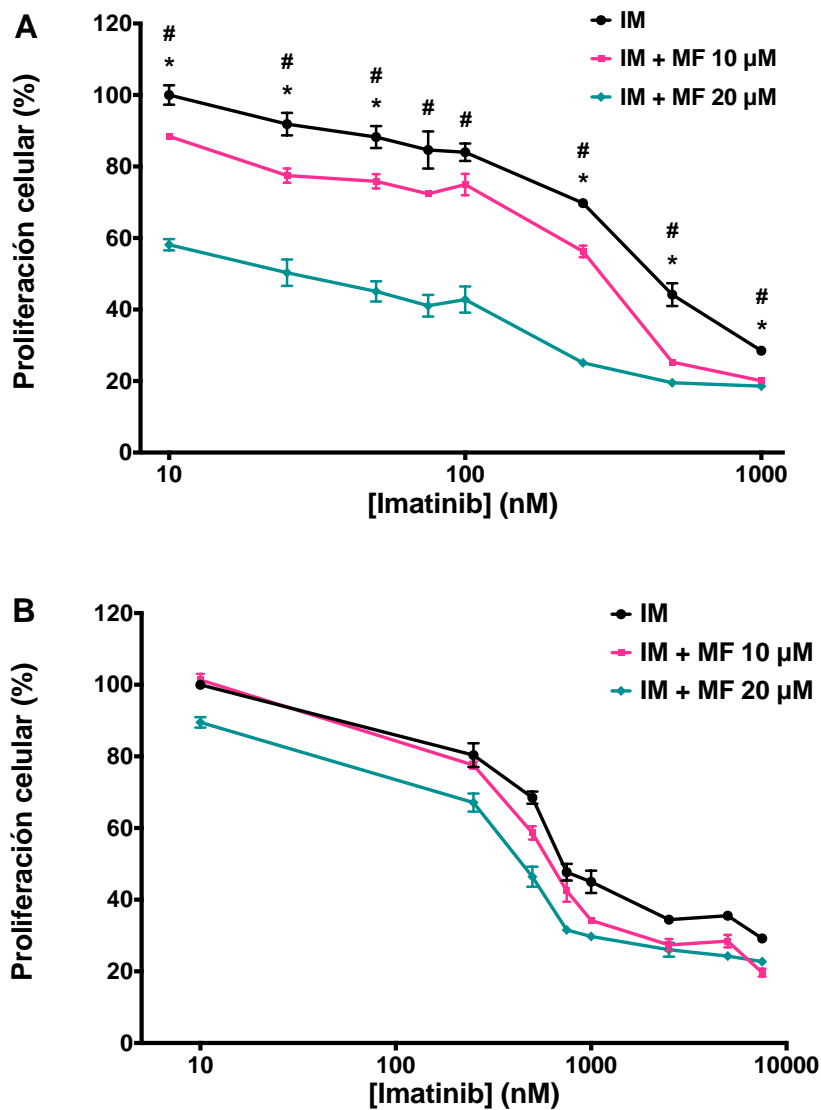


Figura 12. Proliferación de las líneas K562 (A) y K562-RI (B) después de la exposición a imatinib en combinación con mifepristona durante 72 h. Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E. *diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de imatinib solo e imatinib con mifepristona 10 y 20 μ M, respectivamente.

Tabla 7. CI_{50} de imatinib en las líneas K562 y K562-RI expuestas a mifepristona.

Mifepristona (μ M)	CI_{50} (nM)	
	K562	K562-RI
0	477	841
10	260	611
20	35	420

Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E.

Concentración intracelular de imatinib en las líneas K562 y K562-RI

La acumulación intracelular de imatinib en ambas clonas, parental y resistente, se muestra en la Figura 13. Después de la exposición a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de imatinib, se observó una disminución de fármaco en la línea K562-RI con respecto a la línea parental, sin alcanzar significancia estadística.

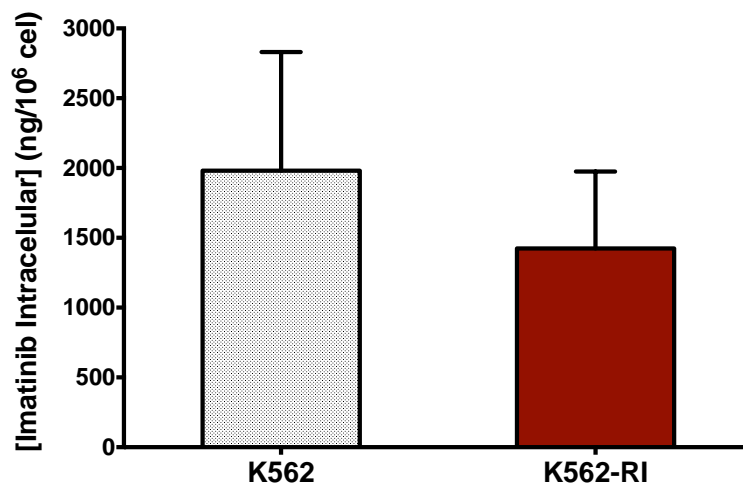


Figura 13. Concentración intracelular de imatinib en las líneas K562 y K562-RI. Se presentan valores promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar.

Concentración intracelular de imatinib en la línea K562 en presencia de ketoconazol o mifepristona

Los inhibidores de P-gp, ketoconazol y mifepristona, fueron utilizados para evaluar de forma indirecta la actividad de la proteína sobre la acumulación intracelular de imatinib. El grupo control corresponde a aquel que fue expuesto únicamente a imatinib, los otros grupos fueron expuestos a imatinib con ketoconazol o con mifepristona.

Después de determinar la concentración intracelular de imatinib, se observó una mayor acumulación intracelular de imatinib en las células que fueron expuestas a ketoconazol o mifepristona, respecto al grupo control (Figura 14).

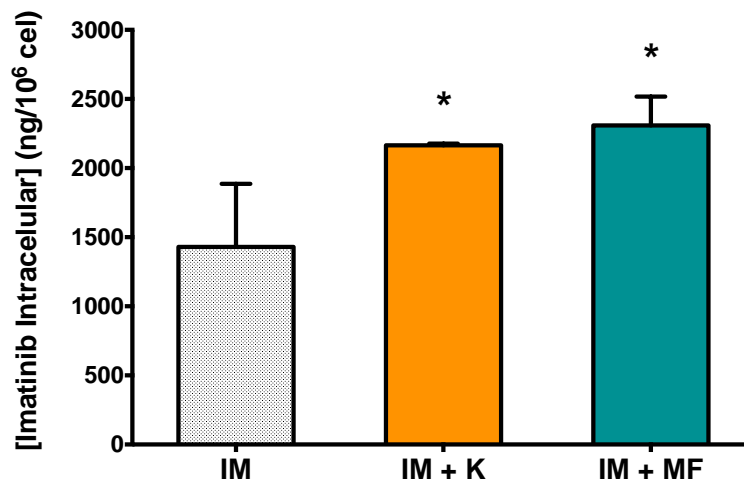


Figura 14. Efecto de los inhibidores de P-gp sobre la acumulación intracelular de imatinib en la línea K562. Se presentan valores promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. *diferencia estadísticamente significativa de imatinib combinado con ketoconazol o mifepristona con respecto a imatinib solo. $p < 0.05$

DISCUSIÓN

El tratamiento con ITC tales como imatinib resulta efectivo en la terapia de LMC. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a estos fármacos por la mutación de la proteína BCR-ABL y la sobreexpresión de bombas de eflujo, como P-gp y MRP, ocurren eventualmente y, aunque poco se conoce sobre el transporte de imatinib al medio intracelular, Thomas et al.⁷⁸ demostraron que se trata de un proceso predominantemente activo. Por lo anterior, resulta importante identificar alternativas de tratamiento capaces de superar la resistencia al tratamiento. En células de LMC se ha reportado que la proteína P-gp es uno de los transportadores de fármacos más relevantes y su inhibición puede contrarrestar parcialmente la resistencia a fármacos como imatinib. Es por ello que en este trabajo se evaluó la eficacia del tratamiento con imatinib en combinación con dos inhibidores de P-gp, ketoconazol y mifepristona.

Para investigar la participación de P-gp sobre los mecanismos de resistencia a imatinib en LMC se desarrolló una línea celular resistente a imatinib (K562-RI) a partir de una selección de la línea celular K562. Después de ocho meses de exposición continua a concentraciones crecientes de imatinib se logró obtener una clona de células aproximadamente once veces más resistentes al fármaco. Un mecanismo relacionado con la resistencia a imatinib podría ser la sobreexpresión de P-gp. Los resultados presentes en este trabajo son consistentes con el trabajo previo de Assef et al,⁷⁹ en el que demostraron que la exposición continua al antineoplásico vincristina produce la sobreexpresión funcional de P-gp, así como el desarrollo de resistencia cruzada a fármacos estructuralmente no relacionados,

entre ellos imatinib. La resistencia a imatinib fue revertida significativamente en presencia de verapamilo, un inhibidor de P-gp.

En otro estudio reportado por Peng et al⁸⁰ evaluaron la actividad de imatinib en dos líneas de K562, una de ellas resistente al fármaco, y demostraron que la resistencia se debe a la sobreexpresión de P-gp. Sin embargo, es probable que otros mecanismos contribuyan al desarrollo de la resistencia a imatinib, como aquellos relacionados con la proteína BCR-ABL. Estos mecanismos podrían relacionarse con mutaciones puntuales en el dominio cinasa o la amplificación del gen BCR-ABL.^{81,82} Aunque no se ha reportado que imatinib induzca directamente estas mutaciones, sí favorece la selección de las clonas Ph positivas que las presentan y que poseen ventajas de crecimiento debido a las mismas.

Otros reportes previos han demostrado que la sobreexpresión de P-gp confiere resistencia a imatinib en diferentes tipos de células. Mahon et al⁸³ analizaron el efecto del gen MDR1 en líneas celulares cuya sobreexpresión es independiente de la exposición a imatinib. Observaron que línea celular K562 resistente a doxorubicina mostraba sobreexpresión de P-gp como respuesta a la exposición a antraciclinas, mientras que en la línea AR230, la sobreexpresión de esta proteína se obtuvo mediante la transfección del gen MDR1. Sin importar el origen de la sobreexpresión del gen MDR1, ambas líneas fueron marcadamente resistentes a imatinib, mostrando una disminución en la proliferación celular.

Por otra parte, varios estudios también sugieren que otros transportadores, como BCRP y hOCT1, podrían estar relacionados con el proceso de resistencia a imatinib.^{84,85}

Los transportadores ABC han sido relacionados con la adquisición de resistencia a múltiples agentes terapéuticos, ya que regulan la concentración de fármacos dentro de la célula al exportarlos fuera de ella. P-gp es el transportador de eflujo más estudiado y ha sido descrito como mediador de la extrusión de imatinib.⁸⁶ En nuestro trabajo se determinó la acumulación intracelular de imatinib para evaluar de forma indirecta la función de P-gp. Nuestros resultados demostraron que hay una menor acumulación intracelular de imatinib en células K562-RI comparadas con células K562 parentales. Estos resultados sugieren que la resistencia de K562-RI podría estar mediada por mecanismos que alteran la concentración intracelular de imatinib, como los transportadores ABC. Adicionalmente, otros reportes han demostrado que células con sobreexpresión de P-gp presentan menores concentraciones intracelulares de imatinib.^{87,88}

Dado que los transportadores ABC están relacionados con la resistencia a fármacos, podrían ser utilizados como blancos terapéuticos. De acuerdo con esta hipótesis, en el presente trabajo se estudió la influencia de dos inhibidores de P-gp, ketoconazol y mifepristona, sobre la eficacia de imatinib.

Ketoconazol ha sido reportado como un antifúngico con la propiedad de inhibir el transporte mediado por P-gp. Nuestros resultados demostraron que ketoconazol influye sobre el efecto antiproliferativo de imatinib. La inhibición observada fue de 1.5 y 7.5 veces para K562 y K562-RI, respectivamente. Esta disminución sugiere que la resistencia observada en la clona K562-RI podría estar relacionada con la sobreexpresión de P-gp. La exposición a ketoconazol podría inhibir la actividad de la proteína, permitiendo un mayor efecto de imatinib y una posible reversión de la resistencia mostrada por estas células.

Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Wang et al.⁸⁹ en el que demostraron la inhibición del transporte mediado por P-gp con antifúngicos azólicos, como itraconazol y ketoconazol, en la línea celular NIH-3T3-G185 de fibroblastos de ratón en presencia de daunorubicina como sustrato marcador.

Con respecto a mifepristona en combinación con imatinib, la proliferación celular disminuyó 14 veces en la clona sensible, mientras que en la clona resistente la disminución fue de dos veces. Esto sugiere que mifepristona podría, además de ocasionar muerte celular por inhibición del transporte de imatinib, ejercer otros mecanismos como arresto celular. Estudios previos indican que mifepristona es un potente agente citostático en células humanas. El arresto celular en fase G₁ tras exposición a mifepristona ha sido reportado en células de adenocarcinoma gástrico,⁹⁰ células de cáncer de mama⁹¹ y células de cáncer de ovario.⁹² Además es posible que el efecto citostático sea mediado por la acción de receptores a progesterona; sin embargo, la acción antiproliferativa de mifepristona también ha sido observada en células que no expresan dichos receptores,⁹³ sugiriendo que mifepristona puede mostrar efectos tanto dependientes como independientes de receptores hormonales relacionados con la inhibición del crecimiento celular.

La mejor respuesta a imatinib se observó en combinación con la concentración más alta de mifepristona (20 μ M). Varios estudios farmacocinéticos reportan que cuando se administra en dosis de 10 a 800 mg, la mifepristona alcanza concentraciones séricas desde 2.5 hasta 20 μ M.⁹⁴⁻⁹⁶ Asimismo, Geick et al.⁹⁷ demostraron que utilizando una concentración 10 μ M se logra observar la inhibición de la expresión de P-gp en una línea de carcinoma de colon.

De acuerdo con estos antecedentes y con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, proponemos que mifepristona actúa inhibiendo el transporte de imatinib mediado por P-gp, favoreciendo su acumulación en el interior de la célula y provocando su muerte con una menor concentración.

Por otra parte, se observó una mayor acumulación intracelular de imatinib en presencia de los inhibidores en células K562 parentales. Un mecanismo que podría explicar este resultado es que, en ausencia de los inhibidores, imatinib ingresa al interior de la célula y es transportado nuevamente al medio extracelular por la acción de P-gp. Como ketoconazol y mifepristona son inhibidores competitivos de P-gp, el resultado es una mayor acumulación intracelular de imatinib.

Generalmente se acepta que el efecto del gen MDR1 es el de reducir la acumulación intracelular de fármacos a través del eflujo mediado por P-gp, disminuyendo su eficacia y la concentración óptima en el sitio de acción. Como se mencionó anteriormente, Mahon et al⁸³ demostraron que la sobreexpresión del gen MDR1 otorga resistencia a imatinib, pero no elucidaron las consecuencias de dicha sobreexpresión sobre la disponibilidad de imatinib intracelular. No obstante, Widmer et al⁸⁷ reportan evidencia de la influencia de P-gp sobre la acumulación intracelular de imatinib mediante un estudio en el que células MDR1 positivas expulsan al fármaco eficientemente. En células MDR1 positivas, la relación entre la concentración intracelular y extracelular permanece constante, indicando que el eflujo de imatinib mediado por P-gp nunca se satura bajo las concentraciones analizadas. En contraste, el incremento de la acumulación de imatinib intracelular en células MDR1 negativas sugiere un transporte menos eficiente y saturable.

Este experimento confirma que el eflujo de imatinib mediado por P-gp, producto del gen MDR1, podría considerarse seriamente como un mecanismo de resistencia a imatinib.

P-gp representa un importante mecanismo celular que contribuye a la resistencia a imatinib, por lo que su inhibición podría acentuar la citotoxicidad al aumentar la concentración de imatinib y su acumulación intracelular y, como consecuencia, limitar potencialmente la adaptación de mecanismos moleculares que favorezcan la resistencia al fármaco.

Los resultados presentes en este trabajo muestran que la eficacia de imatinib está asociada a niveles de acumulación intracelular adecuados. A pesar del hecho de que no se pueden descartar otros mecanismos de transporte del fármaco, la baja eficacia de imatinib en la línea resistente sugiere que P-gp juega un papel importante en la resistencia al fármaco. De acuerdo con lo anterior, una terapia destinada a interferir con la actividad del transportador podría modular la resistencia al fármaco. De acuerdo con un estudio realizado por List et al⁹⁸ la expresión de P-gp es detectada en alrededor del 60% de los pacientes en etapas avanzadas de LMC, los cuales podrían resultar beneficiados con una terapia combinada de ketoconazol e imatinib o análogos. Esta terapia tendría por objetivo actuar sobre la proteína de fusión BCR-ABL y la proteína de transporte P-gp, generando un incremento en la concentración intracelular de imatinib y aumentando así el efecto terapéutico.

CONCLUSIÓN

A partir de la línea celular K562 de LMC sensible a imatinib se desarrolló una clona resistente al fármaco. Esta clona resistente mostró una menor acumulación intracelular de imatinib.

Los inhibidores de P-gp, ketoconazol y mifepristona, incrementaron el efecto antiproliferativo de imatinib en las líneas K562 y K562-RI.

Ketoconazol y mifepristona incrementaron la concentración intracelular de imatinib en la línea K562 de LMC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Apperley, J. F. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **385**, 1447–59 (2015).
2. Faderl, S. *et al.* The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **341**, 164–72 (1999).
3. Redaelli, A. *et al.* Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **4**, 85–96 (2004).
4. Innes, A. J. & Apperley, J. F. Chronic Myeloid Leukemia–Transplantation in the Tyrosine Kinase Era. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **28**, 1037–1053 (2014).
5. Deininger, M. W. N., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343–3356 (2000).
6. David A Hungerford, P. C. N. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science (80-.).* **132**, 1457–1501 (1960).
7. Rowley, J. D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
8. Melo, J. V. The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype. *J. Am. Soc. Hematol.* **88**, 10 (1996).
9. Goldman, J. M. & Melo, J. V. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **344**, 1084–1086 (2001).
10. Holyoake, D. T. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. *Br. J. Haematol.* **113**, 11–23 (2001).
11. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J. & Witte, O. N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science (80-.).* **247**, 1079–1082 (1990).
12. Herrera-Gómez, A. & Granados-García, M. *Manual de Oncología. Procedimientos Médico Quirúrgicos.* (McGraw Hill, 2010).
13. Cortes, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **18**, 569–584 (2004).
14. Clarkson, B., Strife, A., Wisniewski, D., Lambek, C. L. & Liu, C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia* **17**, 1211–1262 (2003).
15. Mauro, M. J. & Deininger, M. W. Chronic myeloid leukemia in 2006: a perspective. *Haematologica* **91**, 152 (2006).

16. Therapy, B. Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy. Report of the Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia. *Br. J. Haematol.* **1**, 201–208 (1968).
17. Hehlmann, R. *et al.* Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* **82**, 398–407 (1993).
18. Bonifazi, F. *et al.* Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood* **98**, 3074–3081 (2001).
19. Hehlmann, R. *et al.* Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* **84**, 4064–4077 (1994).
20. Talpaz, M. *et al.* Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1065–1069 (1986).
21. Cortes, J. *et al.* Suppression of cytogenetic clonal evolution with interferon alfa therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.* **16**, 3279–3285 (1998).
22. Guilhot, F. *et al.* Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 223–229 (1997).
23. Enright, H. *et al.* Related donor marrow transplant for chronic myeloid leukemia: patient characteristics predictive of outcome. *Bone Marrow Transpl.* **17**, 537–542 (1996).
24. Pavlu, J., Szydlo, R. M., Goldman, J. M. & Apperley, J. F. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* **117**, 755–763 (2011).
25. Fefer, A. *et al.* Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *N. Engl. J. Med.* **300**, 333–337 (1979).
26. Goldman, J. M. Marrow transplantation for patients in the chronic phase of chronic granulocytic leukaemia. *Lancet* **320**, 623–625 (1982).
27. Hansen, J. a *et al.* Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **338**, 962–968 (1998).
28. Barrett, J. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia. *Semin. Hematol.* **40**, 59–71 (2003).
29. Vela Ojeda, J. *et al.* Trasplante alogénico de células hematopoyéticas en leucemia mieloide crónica en México. *Gac. Med. Mex.* **136**, 167–168 (2000).

30. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Ab1 tyrosine kinase on the growth of Bcr-Ab1 positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–566 (1996).
31. Johnson, J. R. *et al.* Approval summary: imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1972–1979 (2003).
32. Cohen, M. H., Johnson, J. R. & Pazdur, R. U.S. food and drug administration drug approval summary: Conversion of imatinib mesylate (STI571; Gleevec) tablets from accelerated approval to full approval. *Clin. Cancer Res.* **11**, 12–19 (2005).
33. Atallah, E., Kantarjian, H. & Cortes, J. Emerging safety issues with imatinib and other Abl tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Lymphoma Myeloma* **7**, S105–S112 (2007).
34. Rochat, B., Fayet, A. & Widmer et al, N. Imatinib metabolite profiling in parallel to imatinib quantification in plasma of treated patients using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **43**, 736–752 (2008).
35. Gschwind, H.-P. *et al.* Metabolism and Disposition of Imatinib Mesylate in Healthy Volunteers. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1503–1512 (2005).
36. Wilkinson, G. R. Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2211–2221 (2005).
37. Chen, Y. *et al.* P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**, 956–963 (2009).
38. Peng, B., Lloyd, P. & Schran, H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clinical Pharmacokinetics* **44**, 879–894 (2005).
39. Tanaka, C. *et al.* Clinical pharmacokinetics of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Clinical pharmacology and therapeutics* **87**, (2010).
40. van Erp, N. P., Gelderblom, H. & Guchelaar, H.-J. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 692–706 (2009).
41. Kantarjian, H. *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **346**, 645–52 (2002).
42. Sawyers, C. L. *et al.* Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: Results of a phase II study. *Blood* **99**, 3530–3539 (2002).
43. Talpaz, M. *et al.* Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: Results of a phase 2 study. *Blood* **99**, 1928–1937 (2002).
44. Apperley, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **8**, 1018–1029 (2007).

45. Redaelli, S. *et al.* Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 469–471 (2009).
46. Yang, K. & Fu, L. Mechanisms of resistance to BCR–ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **93**, 277–292 (2015).
47. Borst, P. & Elferink, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 537–92 (2002).
48. Stromskaya, T. P. *et al.* Role of P-glycoprotein in evolution of populations of chronic myeloid leukemia cells treated with imatinib. *Biochemistry* **73**, 29–37 (2008).
49. Chapuy, B. *et al.* ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica* **94**, 1528–1536 (2009).
50. DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J. & Kim, R. B. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 249–73 (2012).
51. Trnková, Z. *et al.* Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma* **54**, 383–390 (2007).
52. Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* **11**, 1156–1166 (2001).
53. Juliano, R. L. & Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembr.* **455**, 152–162 (1976).
54. Chen, C. jie *et al.* Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**, 381–389 (1986).
55. Hennessy, M. & Spiers, J. P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological Research* **55**, 1–15 (2007).
56. Sharom, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **9**, 105–127 (2008).
57. Higgins, C. F., Callaghan, R., Linton, K. J., Rosenberg, M. F. & Ford, R. C. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 135–42 (1997).
58. Gottesman, M. M. & Pastan, I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annual Review of Biochemistry* 385–427 (1993).
59. Higgins, C. F. & Gottesman, M. M. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 18–21 (1992).
60. Sharom, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* **50**, 161–178 (2011).

61. Ueda, K., Taguchi, Y. & Morishima, M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin. Cancer Biol.* **8**, 151–159 (1997).
62. Brendel, C. *et al.* Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia* **21**, 1267–1275 (2007).
63. Ozvegy-Laczka, C. *et al.* High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1485–1495 (2004).
64. White, D. L. *et al.* OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* **108**, 697 LP-704 (2006).
65. Pauwels, E. K. J., Erba, P., Mariani, G. & Gomes, C. M. F. Multidrug resistance in cancer: its mechanism and its modulation. *Drug News Perspect.* **20**, 371–377 (2007).
66. Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **41**, 1967–1972 (1981).
67. Shapiro, A. B. & Ling, V. Effect of quercetin in Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 587–596 (1997).
68. Drori, S., Eytan, G. D. & Assaraf, Y. G. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability. *Eur. J. Biochem.* **228**, 1020–1029 (1995).
69. Varma, M. V. S., Ashokraj, Y., Dey, C. S. & Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: A perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* **48**, 347–359 (2003).
70. Haouala, A. *et al.* Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* **117**, 75–87 (2011).
71. Dutreix, C. *et al.* Pharmacokinetic interaction between ketoconazole and imatinib mesylate (Glivec) in healthy subjects. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54**, 290–294 (2004).
72. Siegsmond, M. J. *et al.* Ketoconazole effectively reverses multidrug resistance in highly resistant KB cells. *J. Urol.* **151**, 485–491 (1994).
73. C.H., P., E.H.Y., N. & S.T., O. Mifepristone: Contraceptive and non-contraceptive uses. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **14**, 325–330 (2002).
74. Spitz, I. M. Clinical utility of progesterone receptor modulators and their effect on the endometrium. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **21**, 318–324 (2009).
75. Slayden, O. D. & Brenner, R. M. Hormonal regulation and localization of estrogen, progesterin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists. *Arch. Histol. Cytol.* **67**, 393–409 (2004).

76. Gaddy, V. T. *et al.* Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5215–5225 (2004).
77. Narvekar, N. *et al.* Low-Dose Mifepristone Inhibits Endometrial Proliferation and Up-Regulates Androgen Receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2491–2497 (2004).
78. Thomas, J., Wang, L., Clark, R. E. & Pirmohamed, M. Active transport of imatinib into and out of cells : implications for drug resistance. *Blood* **104**, 3739–3746 (2004).
79. Assef, Y. *et al.* Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leuk. Res.* **33**, 710–716 (2009).
80. Peng, X. X., Tiwari, A. K., Wu, H. C. & Chen, Z. S. Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells. *Chin. J. Cancer* **31**, 110–118 (2012).
81. O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **348**, (2003).
82. Druker, B. J. *et al.* Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *The New England journal of medicine* **344**, (2001).
83. Mahon, F. X. *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **101**, 2368–2373 (2003).
84. Rumpold, H. *et al.* RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Exp. Hematol.* **33**, 767–775 (2005).
85. Burger, H. *et al.* Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 747–752 (2005).
86. Alves, R. *et al.* Drug transporters play a key role in the complex process of Imatinib resistance in vitro. *Leuk. Res.* **39**, 355–360 (2015).
87. Widmer, N., Colombo, S., Buclin, T. & Decosterd, L. A. Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. *Blood* **102**, 1142 LP-1142 (2003).
88. Illmer, T. *et al.* P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* **18**, 401–8 (2004).

89. Wang, E. J., Lew, K., Casciano, C. N., Clement, R. P. & Johnson, W. W. Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 160–165 (2002).
90. Li, D.-Q. *et al.* Effects of mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro. *World J. Gastroenterol.* **10**, 2628–2631 (2004).
91. Musgrove, E. a, Lee, C. S., Cornish, a L., Swarbrick, A. & Sutherland, R. L. Antiprogesterin inhibition of cell cycle progression in T-47D breast cancer cells is accompanied by induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol. Endocrinol.* **11**, 54–66 (1997).
92. Rose, F. V & Barnea, E. R. Response of human ovarian carcinoma cell lines to antiprogesterin mifepristone. *Oncogene* **12**, 999–1003 (1996).
93. Liang, Y. *et al.* Induction of antiproliferation and apoptosis in estrogen receptor negative MDA-231 human breast cancer cells by mifepristone and 4-hydroxytamoxifen combination therapy: a role for TGFbeta1. *Int. J. Oncol.* **23**, 369–380 (2003).
94. Heikinheimo, O. Pharmacokinetics of the antiprogesterone RU 486 in women during multiple dose administration. *J. Steroid Biochem.* **32**, 21–25 (1989).
95. Shoupe, D. *et al.* Effects of antiprogesterone RU 486 in normal women. II. Administration in the late follicular phase. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **157**, 1421–1426 (1987).
96. Kawai, S. *et al.* Pharmacokinetic properties of the antiglucocorticoid and antiprogesterone steroid RU 486 in man. *J. Pharmacol.* **241**, 401–406 (1987).
97. Geick, A., Eichelbaum, M. & Burk, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14581–7 (2001).
98. List, A. F. *et al.* Cyclosporine inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia blast phase. *Blood* **100**, 1910–1912 (2002).