

7
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA
RESISTENCIA A FARMACOS EN LA
CELULA TUMORAL**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
FERNANDO ALCANTAR MAGAÑA



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	6
La célula tumoral	
Oncogenes	
Fármacos antitumorales	
RESISTENCIA A FARMACOS EN LA CELULA TUMORAL	18
Acumulación y retención de fármacos en la célula tumoral	
Alteraciones a nivel membranar	
Homología entre glucoproteína-P y proteínas bacterianas de transporte	
Papel del ATP en el transporte de fármacos	
Modelos propuestos para el funcionamiento de la glucoproteína-P	
Otros cambios celulares asociados con la resistencia a múltiples fármacos	
Disminución de la resistencia mediante agentes específicos	
BASES GENETICAS DE LA RESISTENCIA A MULTIPLES FARMACOS	40
Identificación de los genes asociados con la resistencia a múltiples fármacos	
Amplificación genética en las células resistentes a múltiples fármacos	
Identificación de transcritos correspondientes a la glucoproteína-P	
CONCLUSION	51
BIBLIOGRAFIA	54

I N T R O D U C C I O N

El desarrollo de resistencia de las células tumorales frente a fármacos citotóxicos es considerada una de las principales causas de fracaso en la quimioterapia clínica contra el cáncer.

Al observar este fenómeno en el campo clínico, se encuentra que el tratamiento inicial de un paciente con cáncer resulta adecuado, pero los subsecuentes tratamientos son progresivamente menos fructíferos(54).

Las observaciones anteriores se derivan de las características de muchos tumores de ser refractarios al tratamiento con agentes anticancerosos, ya sea aplicados en forma individual o en combinación, por lo que la utilidad clínica de estos agentes puede verse severamente limitada por la aparición de células malignas resistentes.

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

Aún cuando las bases bioquímicas de la resistencia frente a múltiples fármacos no están plenamente establecidas, se han realizado estudios tomando en cuenta la captación, acumulación y eliminación de los fármacos en las células tumorales, observándose una correlación entre el grado de resistencia y los cambios en estos factores.

Las características de la resistencia frente a múltiples fármacos son las siguientes(14):

- Resistencia cruzada frente a fármacos no relacionados, estructural ni funcionalmente.
- Disminución en la acumulación intracelular del fármaco.
- Expresión aumentada de una glucoproteína en la membrana plasmática, la cual está asociada con la resistencia a múltiples fármacos (Glucoproteína-P).

- Amplificación y expresión del gene que codifica para la glucoproteína-P.

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

- Presencia de una proteína pequeña de baja masa molecular (19-22 KDa.), denominada sorcina/V-19 o p21(14).
- Alteración en la actividad de enzimas.
- Incremento en la reparación de lesiones citotóxicas.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión de la literatura sobre el problema de la resistencia frente a múltiples fármacos que se presenta en las células tumorales al ser tratadas con agentes quimioterapéuticos y su implicación en el organismo humano.

GENERALIDADES

LA CELULA TUMORAL

Una célula tumoral puede ser definida como aquella célula que se multiplica sin control, evadiendo la regulación que lleva a cabo el organismo.

Entre las características generales que pueden considerarse como propias de las células tumorales se encuentran la proliferación descontrolada y la formación de metástasis (en células cancerosas).

A nivel citológico se han encontrado las siguientes alteraciones:

- Alteración en la permeabilidad y transporte a nivel membranal.
- Modificación en la adhesión y en la inhibición por contacto.
- Pérdida o modificación de glucoproteínas y glucolípidos.
- Deterioro de la comunicación intercelular y de la inhibición del crecimiento.
- Alteración en la actividad de algunas enzimas.

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

La proliferación descontrolada de las células puede dar origen a un tumor benigno o a un tumor maligno (cáncer), la característica principal que hace diferentes a estos dos crecimientos descontrolados es la capacidad de establecerse en sitios distantes al crecimiento tumoral primario.

De este modo, cuando las células anormales se multiplican sin control, pero se mantienen dentro de una localización estable y no invaden otros tejidos, se forma un tumor benigno.

Por otro lado, cuando la masa celular puede separarse del crecimiento tumoral primario y viajar a través del sistema circulatorio o por vía linfática para establecerse en otros tejidos adecuados para su desarrollo, se forma un tumor maligno o cáncer. Este proceso presentado por las células cancerosas se denomina metástasis.

Las características principales del comportamiento de las

células tumorales son probablemente consecuencia de modificaciones en la superficie celular, ya que en el tumor estas modificaciones contribuyen indudablemente al escape de muchos de los factores que mantienen a las células normales bajo control(29).

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

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

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

Cabría esperar que las alteraciones en la estructura celular asociadas al proceso maligno deben dirigir al sistema inmunológico al reconocimiento de las células tumorales, ya que en la circulación sanguínea se encuentran células asesinas(killer), las cuales pueden reconocer a muchos tipos de células tumorales, sin afectar a las células normales.

A pesar de esto, las células tumorales han encontrado formas de evadir la detección inmunológica; entre ellas se encuentra el enmascaramiento de antígenos de superficie, que de otra manera serían marcadores que servirían para su destrucción(82).

De esta manera, el reconocimiento inmunológico parece tener un papel minoritario en la protección del organismo contra los tumores.

ONCOGENES

Los oncogenes son versiones alteradas(genes mutados)de los genes que se encuentran presentes en las células normales(47,48).

En la tabla 1 se presentan algunos de los oncogenes que se han reportado en la literatura.

La aparición de oncogenes puede presentarse como consecuencia de mutaciones puntuales y duplicaciones del DNA; sin embargo, también se han encontrado oncogenes en retrovirus, los cuales al integrarse a las células normales pueden transformarlas (29).

Se conocen dos posibles mecanismos mediante los cuales los oncogenes pueden alterar el control del crecimiento celular:

En el primero, las proteínas sintetizadas a partir de la información de oncogenes puede mimetizar a un factor de crecimiento; la interacción entre estas proteínas y el receptor apropiado puede estimular el crecimiento celular.

En el segundo mecanismo, una proteína sintetizada a partir de la información de oncogenes, puede funcionar como un receptor ocupado (receptor para factores de crecimiento), con lo que se emiten señales que estimulan la mitosis en ausencia de factores de crecimiento normales.

Entre los factores de crecimiento se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (47).

En la membrana plasmática de células tumorales se han localizado proteínas alteradas, la similitud que presentan éstas con los receptores para factores de crecimiento EGF y PDGF, sugiere que muchas proteínas sintetizadas a partir de la información de oncogenes, trabajan activando señales que estimulan el crecimiento, análogas a las que se presentan en la célula normal.

Sin embargo, estas señales dan como resultado un crecimiento no controlado (29), lo que sugiere que dichas señales pueden ser la base de la oncogénesis.

Aún cuando el descubrimiento de los oncogenes fue un suceso relevante en la investigación del cáncer, aún no se sabe si el cáncer o cuales de las etapas de la carcinogénesis son causadas por oncogenes, o si la alteración que se presenta en los genes normales (con la aparición de oncogenes) es el producto de la transformación celular.

Tabla 1.

PROTO-ONCOGENES Y SUS PRODUCTOS⁴⁵

Proto-oncogene	Producto del oncogene	Actividad	Localización celular	Ref.
sis	Cadena B de PDGF	Antagonista de PDGF	Secretada	52
erbB	Receptor para EGF	Tirosincinasa	Membrana plasmática	33
fms	Receptor para CSF-1	Tirosincinasa	Membrana plasmática	47
neu	Receptor?	Tirosinacinasa	Membrana plasmática	45
met	Receptor?	Tirosincinasa	Membrana plasmática	45
ros	Receptor para insulina	Tirosincinasa	Membrana plasmática	48
kit	Receptor?	Tirosincinasa	Membrana plasmática	47
trk	Receptor?	Tirosincinasa	Membrana plasmática	45
ret	Receptor?	Tirosincinasa	Membrana plasmática?	45
src	p60 ^{C-src}	Tirosincinasa	Membrana plasmática	88
yes	p59/62 ^{C-yes}	Tirosincinasa	Membrana plasmática	48
fps/fes	p98 ^{C-fps} /p92 ^{C-fes}	Tirosincinasa	Citoplasma/Membrana plasmática	47 45
abl	p150 ^{C-abl}	Tirosincinasa	Citoplasma	48
fgr	?	Tirosincinasa	Membrana plasmática	47
Ha-ras	p21 ^{C-Ha-ras}	Unión a GTP	Membrana plasmática	7
Ki-ras	p21 ^{C-Ki-ras}	Unión a GTP	Membrana plasmática	7

Tabla 1.

PROTO-ONCOGENES Y SUS PRODUCTOS (Continuación)⁴⁵

Proto-oncogenes	Producto del oncogene	Actividad	Localización celular	Ref
N-ras	p21	Unión a GTP	Membrana plasmática	7
mos	?	Serina/Treoninasa	Citoplasma	48
raf/mil	p71/p73 ^{C-mil}	Serina/Treoninasa	Citoplasma	47 48
myc	p58 ^{C-myc}	Unión a DNA	Núcleo	62
N-myc	?	?	Núcleo	45
fos	p55 ^{C-fos}	Unión a DNA	Núcleo	64
myb	p75 ^{C-myb}	Unión a DNA	Núcleo	62
erbA	Receptor para hormona tiroidea	Unión a DNA	Núcleo	50
ets	?	?	Núcleo	50

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

CSF: Factor-1 estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.

FARMACOS ANTITUMORALES

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

El desarrollo de resistencia de las células tumorales frente a agentes citotóxicos es considerada una de las principales causas de fracaso en la quimioterapia clínica(17).

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

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

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

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

Por fortuna, las células normales en proliferación rápida y las cancerosas no tienen la misma vulnerabilidad y aún puede utilizarse el principio de toxicidad selectiva. Sin embargo se advierte que el margen de seguridad es muy estrecho.

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

- a. Antimetabolitos.
- b. Agentes alquilantes.
- c. Antibióticos antitumorales.

- d. Alcaloides tumorales
- e. Otros agentes antitumorales,

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

- i. Aquellos que interfieren en la síntesis de precursores de DNA.
- ii. Aquellos que interactúan químicamente con el DNA.

ANTIMETABOLITOS

Los antimetabolitos son compuestos que poseen una estructura molecular similar a aquella que presentan los metabolitos normales de la célula con los cuales compiten; así, estos compuestos son aceptados como sustratos análogos que intervienen en reacciones bioquímicas vitales y de este modo interfieren con los procesos celulares (26).

Estos compuestos fueron introducidos para el tratamiento de crecimientos malignos por Faber y colaboradores, quienes demostraron en 1948 que el análogo del ácido fólico denominado aminopterina era útil en el tratamiento de leucemias agudas (12).

La aminopterina ha sido reemplazada por la ametopterina o por el metotrexate, este último aunque menos potente, presenta efectos secundarios mejor conocidos.

Dentro de los antimetabolitos, el compuesto modelo es el metotrexate, el cual es un análogo del ácido fólico que es transportado al interior celular por medio del acarreador membranal encargado de la captación y transporte de los folatos reducidos con actividad fisiológica (24).

El metotrexate ejerce su efecto citotóxico al inhibir a la enzima dihidrofolato reductasa. Esta enzima es la responsable del mantenimiento de la reserva intracelular de folatos en estado reducido (forma activa), a su vez los tetrahidrofolatos funcionan como acarrea-

dores de grupos de un átomo de carbono para la síntesis de nucleótidos de purina y timidilato.

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

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

Después de eliminar el fármaco inicial libre (metotrexate), los poliglutamatos son retenidos intracelularmente, por lo que la formación de éstos puede ser un factor determinante para la duración del efecto del fármaco en las células malignas, ya que la muerte celular es proporcional al tiempo de exposición al fármaco, así como a la dosis aplicada (11,26).

El grupo de los antimetabolitos está constituido por los siguientes fármacos: Metotrexate, 5-fluorouracilo, citidinarabinosido, 6-mercaptopurina, arabinofuranosiladenina (ARA-A).

AGENTES ALQUILANTES

Entre los más notables agentes que interactúan con el DNA, se encuentran los fármacos conocidos como agentes alquilantes, denominados así por su capacidad para formar enlaces covalentes con los ácidos nucleicos. En esta reacción se unen grupos alquilo al DNA, los cuales interfieren con su integridad y función (26).

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

La alquilación trae como consecuencia la inhibición de la síntesis

de DNA, RNA y de proteínas(26).

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

Aunque los agentes alquilantes muestran un mecanismo de acción común, se presentan grandes diferencias en sus características de reactividad química, liposolubilidad y transporte a través de la membrana, por lo que no es posible observar una resistencia cruzada uniforme entre estos fármacos al ser usados en la quimioterapia(24,26).

Dentro de los agentes alquilantes se encuentran los siguientes fármacos: Mostaza nitrogenada, ciclofosfamida, melfalan, clorambucil, busulfan, nitrosourea, cis-platino.

ANTIBIOTICOS ANTITUMORALES

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

El mecanismo de acción propuesto para los antibióticos antitumorales es la unión del fármaco al DNA al intercalarse en las bases nitrogenadas, presentandose una mayor alquilación en la guanina.

Al unirse el fármaco al DNA, no puede llevarse a cabo su replicación a partir del lugar en que se halla presente el fármaco afectando a las células tumorales ya que se están multiplicando(26).

El grupo de los antibióticos antitumorales lo constituyen: Bleomicina, antraciclinas(daunorubicina, doxorubicina), mitomicina C, mitramicina.

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

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

Treonin desaminasa usada en el tratamiento de leucemia murina; azaserina y azotomicina (análogos del ácido glutámico) en el tratamiento de carcinoma pulmonar y de mama; ácido N-fosfonacetilaspártico (análogo del ácido aspártico) en el tratamiento de carcinoma de colon y mama (26).

RESISTENCIA A FARMACOS

EN LA

CELULA TUMORAL

ACUMULACION Y RETENCION DE FARMACOS EN LA CELULA TUMORAL

La resistencia frente a múltiples fármacos está asociada a una baja acumulación intracelular de los mismos. Esto se ha encontrado en diferentes líneas celulares de ratón, hamster y humanas, las cuales fueron seleccionadas en base a su resistencia in vitro (13,53), o in vivo (49,78).

Al seleccionar y comparar líneas celulares con resistencia secuencialmente creciente, se observa que la acumulación del fármaco está relacionada de manera inversa con el grado de resistencia (13, 35).

En 1985 Fojo y col. (35), encontraron que en las células de carcinoma humano (KB), la acumulación de colchicina, vincristina y vinblastina disminuye al incrementarse la resistencia de las células, observándose el mismo efecto, aunque en menor grado al utilizar actinomicina D.

Mientras que Inaba y col. en 1979 (49), observaron una apreciable disminución en la captación y retención de daunorubicina y adriamicina al usar células leucémicas humanas resistentes (P388/ADR).

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

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

La presencia de esta glucoproteína fue demostrada inicialmente en células de hamster resistentes a colchicina ($CH^R C5$), observándose que se expresa en mayor proporción en las células resistentes en comparación con las correspondientes células sensibles (9).

A partir de los estudios realizados por Victor Ling en 1976 (9,14), en los cuales se observa que la baja acumulación intracelu-

lar de colchicina es una característica de las células resistentes que presentan una expresión aumentada de la glucoproteína-P, se postuló que esta glucoproteína podría estar involucrada en la modulación de las propiedades de la membrana, reduciendo la acumulación del agente citotóxico.

Como se mencionó anteriormente, el grado de expresión de la glucoproteína-P es proporcional al grado de resistencia ya que se observó una baja cantidad de la glucoproteína en las células sensibles y revertantes(9,60).

Otra evidencia de que la glucoproteína-P está involucrada en la resistencia a múltiples fármacos proviene de experimentos de transfección, en los cuales las características de dicha resistencia (incluyendo la expresión aumentada de glucoproteína-P) pueden ser transferidas a células sensibles mediante la adición de DNA proveniente de células resistentes a múltiples fármacos(14).

ALTERACIONES A NIVEL MEMBRANAL

En el análisis de un considerable número de células de hamster, ratón y de origen humano resistentes a múltiples fármacos, se demostró que la resistencia se correlaciona de modo directo con la expresión de un antígeno de superficie de 170 KDa., el cual presenta reacción cruzada con la glucoproteína-P(14).

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

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

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

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

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

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

Al examinar 17 diferentes tejidos, 6 de ellos mostraron un relativo elevado nivel en el contenido de glucoproteína-P. Estos tejidos fueron: hígado, páncreas, riñón, colon, yeyuno y glándulas adrenales; sospechándose que en el hígado, riñón e intestino, la glucoproteína puede estar funcionando como un transportador de múltiples compuestos para proteger a la célula animal, ya que estos órganos son sitios a los cuales llegan los productos tóxicos presentes en la dieta y los introducidos al organismo bajo la forma de quimioterápicos, los cuales deben ser removidos (34,40).

En los tejidos estudiados, la glucoproteína-P se localiza en la superficie celular, siendo esta localización adecuada para su papel de transportador (14).

En el hígado de rata, se observa un incremento en la expresión de glucoproteína-P después de un tratamiento a base de sustancias carcinógenas, apoyando la idea de que la expresión aumentada de glucoproteína es una respuesta frente a un desafío con agentes tóxicos.

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

presión apreciable de la glucoproteína-P.

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

Asimismo, se ha observado que la expresión de la glucoproteína-P está relacionada de manera directa con el grado de reincidencia de los pacientes, ya que se observa una expresión clara de esta molécula en pacientes con elevada reincidencia (8-12 veces) (70). Esta última observación, también se encuentra en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda (68).

La glucoproteína-P ha sido caracterizada bioquímicamente como una glucoproteína integrante de la membrana plasmática. Para conocer su estructura, se llevó a cabo el análisis de la porción peptídica de dicha molécula.

De este modo se encontró que existen 1280 residuos de aminoácidos en la molécula de glucoproteína-P obtenida de células humanas resistentes a múltiples fármacos, calculándose una masa molecular de 141 KDa. (34, 40, 80).

La molécula completa de glucoproteína-P parece estar constituida de segmentos transmembranales repetitivos. Cada segmento presenta un extremo N-terminal que contiene un segmento hidrofóbico y un extremo C-terminal que contiene un sitio de unión para ATP, cuya hidrólisis provee de energía para el transporte de fármacos; así como una fracción glucosídica que se proyecta hacia el exterior celular la cual está unida a la porción peptídica de la molécula.

Así, cada uno de estos segmentos estructurales repetitivos contiene una región hidrofílica la cual probablemente se proyecta hacia el citoplasma y una región hidrofóbica que puede estar embebida en la membrana celular, considerándose que la molécula de glucoproteína va entrando y saliendo del citoplasma a lo largo de la membrana en una forma característica formando una especie de poros en la membrana (14).

La orientación de los segmentos transmembranales de la glucoproteína a través de la membrana están en forma tal que la porción C-terminal de la molécula queda hacia el citoplasma, como se había establecido anteriormente mediante anticuerpos monoclonales(80).

Al analizar la secuencia completa de los aminoácidos que integran la porción peptídica de la glucoproteína-P obtenida de células sensibles y resistentes a múltiples fármacos, se observa que dicha secuencia corresponde a la conformación mencionada anteriormente. Esta conformación se presenta en la figura 1.

HOMOLOGIA ENTRE GLUCOPROTEÍNA-P Y PROTEÍNAS BACTERIANAS DE TRANSPORTE

La porción citoplásmica de la glucoproteína-P se asemeja a ciertas proteínas bacterianas de transporte capaces de fijar fármacos(57).

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

Se observa una homología máxima en la región que circunda al sitio de unión para ATP(36).

Por otra parte, la presencia de sitios de unión para ATP en la molécula de glucoproteína-P se deriva de la homología que se presenta en esta región (sitio para unión de ATP) al compararla con otras proteínas bacterianas de transporte que pueden unir ATP tales como hisP, malK, oppD, pstB y rbsA(27,42).

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

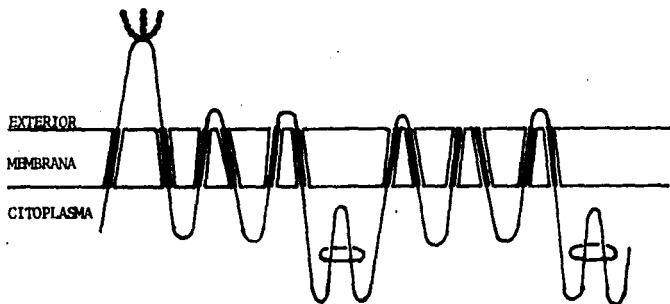


Figura 1. MODELO DE LA GLUCOPROTEINA-P.

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

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

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

De hecho, la proteína hlyB se asemeja más a la glucoproteína-P que a hisP, malK, oppD y pstB(36), abriéndose la posibilidad de que la glucoproteína-P esté involucrada en el transporte de fármacos aprovechando la energía proveniente de la hidrólisis de ATP.

PAPEL DEL ATP EN EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS

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

Al usar rotenona, se observa que en las células normales, el grado de captación de colchicina se incrementa al disminuir la concentración de ATP aproximadamente por debajo de $2.0 \text{ nM ATP}/10^6$ células, mientras que en las células resistentes no se observó estimulación en la captación sino hasta que la concentración de ATP fue menor de $0.5 \text{ nM ATP}/10^6$ células.

En presencia de 2,4-dinitrofenol, se observa que la captación de daunorubicina aumenta; si adicionalmente se agrega glucosa, se observa la excreción del fármaco de las células resistentes, alcanzándose una concentración intracelular muy cercana a la observada en ausencia del inhibidor (observándose un efecto similar con adriamicina), sugiriendo que la adición de glucosa disminuye la captación de los fármacos, probablemente debido a la producción de energía necesaria para el funcionamiento del mecanismo que remueve al fármaco(49), de lo que se deriva que los cambios en el nivel de captación del fármaco están mediados a través de los cambios en la concentración del ATP celular.

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

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

Este hecho apoya la tesis que considera que la alteración en la permeabilidad de la membrana es de vital importancia para reducir la acumulación intracelular del fármaco (14,66).

MODELOS PROPUESTOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LA GLUCOPROTEÍNA-P

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

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

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

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

- a.) La unión entre la glucoproteína-P y el fármaco debe ser

reversible, ya que las moléculas de fármaco tienen que ser liberadas en la superficie celular.

- b.) Debido a que en las células resistentes a múltiples fármacos se presenta resistencia cruzada a fármacos no relacionados estructuralmente, la molécula de glucoproteína-P debe tener sitios de unión diferentes, para los diversos grupos de fármacos hacia los que se presenta esta resistencia cruzada.

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

- i. En las células humanas y de hamster resistentes a múltiples fármacos, se presentan vesículas membranales que muestran expresión aumentada de una proteína de 150-180 KDa., la cual presenta sitios para la unión de vinblastina (19). La identidad entre la proteína de 150-180 KDa., capaz de unir vinblastina y la glucoproteína-P fue probada por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína, encontrándose que se trata de la misma molécula.
- ii. En los experimentos realizados por Pastan y col. en 1986 (9,14), quienes estudiaron la unión de (³H)-vinblastina a las vesículas membranales, se encontró que la unión de vinblastina a las vesículas de células resistentes a múltiples fármacos es mayor que la observada en las células sensibles.

En las vesículas mencionadas anteriormente se observa competencia en la captación de vinblastina al estar presente otro fármaco tal como la vincristina y en menor grado por la presencia de daunorubicina, por lo que existe la posibilidad de que estos fármacos puedan estar compitiendo por el mismo sitio de unión o por

sitios de unión adyacentes. Sin embargo al probar con colchicina y actinomicina D, no se observa competencia por los sitios de unión de la vinblastina a las vesículas membranales de las células resistentes a múltiples fármacos, apoyándose de esta manera la posible existencia de sitios de unión para los diferentes fármacos hacia los que se presenta la resistencia(19,20).

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

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

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

Debido a que el transporte del complejo fármaco-proteína de unión requiere de energía, se estudió este aspecto, encontrándose que la glucoproteína-P presenta cierta actividad de ATPasa, existiendo la posibilidad de que la hidrólisis del ATP realizada por la glucoproteína-P esté acoplada al transporte del fármaco(14).

Este modelo concuerda con los estudios realizados con alcaloides de la vinca y antraciclinas, en los cuales se detectó la presencia de un mecanismo de transporte de fármacos dependiente de ATP (10,49).

Para correlacionar los aspectos bioquímicos y los morfológicos encontrados en las células resistentes a múltiples fármacos se cuenta con el estudio de la ultraestructura de la membrana plasmática realizado por Arsenault y col. en 1988(4), en el cual se observa una gran densidad de partículas intramembranales (IMP) en el extremo protoplásmico de la membrana de células resistentes.

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

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la expresión aumentada de glucoproteína-P conduce hacia cambios globales en la estructura de la membrana plasmática.

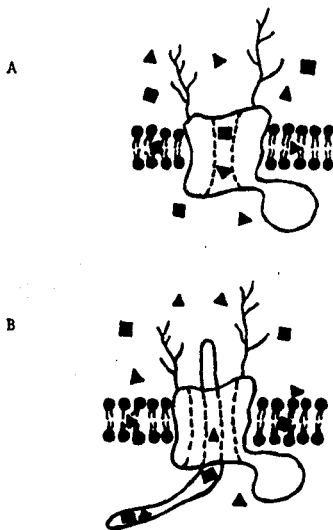


Figura 2. MODELOS PROPUESTOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LA GLUCOPROTEÍNA-P EN LAS CELULAS RESISTENTES

En A la glucoproteína-P exporta directamente a dos fármacos estructuralmente diferentes (■, ▲). En B los fármacos se unen a una proteína (diferente a glucoproteína-P), la cual es posteriormente exportada hacia el exterior por la glucoproteína-P.

Gerlanck, H.J. y col., Nature, 324:485-489, 1986.

OTROS CAMBIOS CELULARES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES FARMACOS

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

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

Entre estos cambios se encuentra la presencia de una pequeña proteína citoplásmica de aproximadamente 19-22 KDa., denominada sorcina/V-19 ó p21(9,83), inicialmente identificada en células resistentes a vincristina.

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

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

En las células resistentes a múltiples fármacos existe correspondencia entre la expresión aumentada de la glucoproteína-P y la expresión aumentada de sorcina, y mediante estudios de genética molecular(14) se encontró que el gene de la sorcina se encuentra próximo al gene de la glucoproteína-P en las células resistentes de hamster y humanas, y al parecer la expresión aumentada del gene de la sorcina es el resultado de su coamplificación debido a su localización contigua al gene de la glucoproteína-P.

Sin embargo, la amplificación y expresión aumentada del gene de la sorcina no se lleva a cabo de manera continua, lo que sugiere

que la producción aumentada de esta proteína(sorcina) no es necesaria para el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos.

También se han descrito cambios en la actividad de algunas enzimas entre las que se encuentran la glutatión transferasa y glutatión peroxidasa(21,25,57), fosfatasa alcalina(9,14) y proteínasa A (14,59).

Glutatión transferasa-Glutatión peroxidasa

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

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

Así mismo se ha observado que al poner en contacto a las células resistentes frente a butioninsulfoximida(BSO)(inhibidor selectivo de la síntesis de glutatión) se observa un agotamiento parcial de glutatión, asociándose con un aumento en la susceptibilidad a adriamicina(55).

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

De este modo se ha propuesto que el aumento en el nivel de actividad de la glutatión transferasa y de glutatión peroxidasa constituyen parte del mecanismo de resistencia contra adriamicina y posiblemente contra otros fármacos involucrados en la resistencia frente a múltiples fármacos.

Proteíncinasa asociada a la resistencia frente a múltiples fármacos

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

Para probar la existencia de un posible sistema de fosforilación asociado a la membrana de células resistentes, se aislaron membranas de células de ovario de hamster resistentes a colchicina, demostrándose la capacidad de utilizar (^{32}P)ATP para fosforilar proteínas endógenas de membrana, así como aceptores exógenos de fósforo tales como caseína y protamina(16).

Posteriormente se encontró que la fosforilación de las proteínas de la membrana de células resistentes es debida a la proteíncinasa A (59).

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

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

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

Proteínfosfatasa asociada a la resistencia frente a múltiples fármacos

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

Por lo tanto, se ha investigado la posible existencia de un sistema de desfosforilación asociado a la resistencia a múltiples fármacos, encontrándose que en células de ratón resistentes a vincristina y adriamicina se presenta una mayor actividad de la fosfatasa alcalina en comparación con las células sensibles(14).

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

También se han descrito ciertos cambios físicos y biológicos a nivel celular asociados a la resistencia a múltiples fármacos.

El cambio biológico mejor conocido es el de reversión de la transformación, fenómeno observado en células resistentes de hamster y ratón, en el cual estas células presentan una tumorigenicidad disminuida al ser transplantadas(14).

Mientras que el cambio físico atribuido a las células resistentes a múltiples fármacos es un aumento en la susceptibilidad a la ruptura mecánica(15,66,76,92).

DISMINUCION DE LA RESISTENCIA MEDIANTE AGENTES ESPECIFICOS

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

La mayoría de estos agentes muestran algunas de las características de los compuestos transportados por la glucoproteína-P incluyendo propiedades lipofílicas y débil basicidad(39). A continuación se presenta la clasificación de estos agentes:

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

Análogos de antraciclinas y alcaloides de la vinca

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

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

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

Estos compuestos incluyen a N-acetildaunorubicina y vindolina.

Dentro de los agentes recientemente encontrados que se sabe son capaces de disminuir la resistencia a múltiples fármacos asociada a la glucoproteína-P se encuentra la camptotecina(58).

Bloqueadores de los canales de calcio e inhibidores de la calmodulina

Los bloqueadores de los canales de calcio son un grupo de compuestos que inhiben la entrada del calcio hacia la célula y con ello el efecto del calcio en las funciones de la misma y de un modo específico en la resistencia a múltiples fármacos, debido a que el calcio es requerido para la formación del complejo Ca^{2+} -Calmodulina necesario para la activación de muchos sistemas enzimáticos dependientes de calcio tales como ATPasa y proteínasas.

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

El análisis de la información muestra que el verapamil es un agente usado con frecuencia en la disminución de la resistencia a múltiples fármacos, observándose que logra antagonizar los efectos de dicha resistencia causada por los alcaloides de la vinca(18).

La concentración de verapamil de 10 μ g/ml., es óptima para aumentar la sensibilidad de las células resistentes a múltiples fármacos, ya que es la concentración para la captación óptima de varios fármacos entre los que se encuentran vincristina, adriamicina y daunorubicina(35).

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

La resistencia presentada por P. falciparum se debe a la excreción de la cloroquina, lo que trae como consecuencia una baja acumulación intracelular de la misma(93).

Al parecer el verapamil antagoniza la resistencia a la cloro-

quina al inhibir su excreción, incrementando con ello la concentración del fármaco en el interior celular, de una manera similar a la disminución de la resistencia a múltiples fármacos en las células de mamífero.

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

De este modo, se logra incrementar la concentración intracelular del fármaco y con ello se observa una mayor citotoxicidad (18).

Este hallazgo está apoyado por experimentos en los cuales se observa que las células resistentes a múltiples fármacos acumulan y retienen una menor cantidad de verapamil en comparación con las células sensibles (94).

También se observa que los inhibidores de la calmodulina tales como trifluoperacina pueden incrementar la acumulación y retención de vincristina, adriamicina y daunorubicina en las células resistentes de ratón, hamster y humanas, resultando ésto en una reversión de la resistencia (35, 86).

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

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

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

oral de verapamil.

Esto ha beneficiado a los pacientes con mieloma, al administrar verapamil junto con vincristina, doxorubicina y dexametasona. Sin embargo el verapamil presenta cierta citotoxicidad cuyas principales manifestaciones son hipotensión moderada y arritmia cardíaca pasajera; afortunadamente estas manifestaciones son toleradas por los pacientes con mieloma en etapa avanzada(28).

Otros agentes

Además de los compuestos mencionados anteriormente, se han encontrado otros agentes moduladores del transporte a nivel membranal que revierten la resistencia a múltiples fármacos e incluyen: Quinidina, tamoxifen, isoprenoides sintéticos, propanolol(14), cloroquina(96) y ciclosporina A(77).

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

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

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

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

Se observa que a una concentración de eritromicina de 250 $\mu\text{g/ml}$, se presenta un incremento en la acumulación intracelular de actinomicina D y doxorubicina en células murinas resistentes(46).

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

Dentro de este grupo, la cefoperazona es la que presenta una mayor efectividad en la modulación de la resistencia a múltiples fármacos, además de presentar una menor toxicidad para el organismo al compararla con el verapamil y con la trifluoperacina ya que estos últimos presentan toxicidad severa a una concentración plasmática inferior a la necesaria para disminuir dicha resistencia(39).

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

De este modo, la ciclosporina A es un agente que puede resultar adecuado para ser combinado con la doxorubicina y daunorubicina que son los medicamentos utilizados en el tratamiento de la leucemia mielocítica aguda(65).

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

BASES GENETICAS
DE LA RESISTENCIA
A MULTIPLES FARMACOS

IDENTIFICACION DE LOS GENES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS

El estudio de los medios por los cuales las células tumorales desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos ha revelado gran cantidad de información acerca de los mecanismos de captación, metabolismo y excreción de fármacos, así como la comprensión de procesos celulares tales como amplificación y regulación de la expresión genética.

La complejidad de la resistencia a múltiples fármacos sugiere que para que se presente, se requieren de múltiples eventos genéticos. Sin embargo, los estudios realizados en células resistentes de hamster han demostrado que la alteración en un solo gene o en un pequeño número de ellos, puede dar origen a la resistencia frente a un fármaco, resistencia cruzada frente a fármacos estructuralmente diferentes y expresión aumentada de la glucoproteína-P en la membrana.

Las observaciones de que el aumento en la expresión de la glucoproteína-P es el cambio bioquímico que se presenta con mayor frecuencia en las células multiresistentes(14), y de que la alteración en un solo gene o un pequeño número de ellos puede dar origen a la resistencia frente a múltiples fármacos, sugiere que una alteración en el gene que codifica para la glucoproteína-P puede ser la causa de tal resistencia.

Con base en las consideraciones anteriores, una aproximación directa al problema de la resistencia es el estudio del gene que codifica para la glucoproteína-P.

De este modo algunos investigadores han clonado genes que comúnmente son amplificados y sobreexpresados en diversas líneas celulares resistentes a múltiples fármacos(42,67,88), encontrándose que estos genes codifican para la glucoproteína-P(42,67,75,84,88). Por lo que la amplificación y el aumento en la expresión parecen ser las alteraciones genéticas predominantes en las células resistentes a múltiples fármacos.

Al aislar el cDNA que codifica para la glucoproteína-P, se obtuvo un fragmento de 660 pares de bases (pCHP1) (53), existiendo evidencias que demuestran que el fragmento de cDNA obtenido representa una fracción de uno de los genes que codifican para la glucoproteína-P. Estas evidencias son:

- i. El fragmento pCHP1 aislado codifica para un polipéptido que es reconocido por tres anticuerpos monoclonales los cuales identifican a diferentes regiones de la molécula de glucoproteína-P.
Esto demuestra que el polipéptido codificado por el fragmento pCHP1 forma parte de la glucoproteína-P(14).
- ii. En las células resistentes de hamster (CHO) se detectó un RNAm de 4.7 kilobases, observándose correspondencia entre el contenido de este RNAm, el grado de resistencia y el contenido del fragmento pCHP1(14).
- iii. Se aisló cDNA de células resistentes (análogo al fragmento pCHP1) cuyo análisis de secuenciación reveló una estructura proteica similar a la fracción peptídica de la glucoproteína-P que se encuentra integrada a la membrana(36).

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

Por otro lado se aisló cDNA de genes que presentan una expresión aumentada en células resistentes, bajo el supuesto de que estos genes deberían ser algunos de los que controlan la resistencia a múltiples fármacos(88); en un experimento posterior se encontraron seis fragmentos de cDNA de diferentes tamaños(32), observándose que secuencias similares a las de los seis fragmentos son amplificadas en las células resistentes a múltiples fármacos (CH^RCS) de hamster; por lo que se sospecha que al menos seis genes son amplificados y expresados en forma aumentada en las células resistentes a múltiples fármacos.

De los fragmentos de cDNA aislados, es denominado como clase 2 presenta hibridación cruzada con el cDNA del fragmento pCHP1 de la glucoproteína-P y el análisis posterior de la secuencia del fragmento de clase 2 confirmó que éste codifica para una porción de la glucoproteína-P(14), y que es el único expresado en forma aumentada de manera constante(31).

AMPLIFICACION GENETICA EN LAS CELULAS RESISTENTES A MULTIPLES FARMACOS

En las células humanas KB resistentes a múltiples fármacos se han encontrado amplificadas dos secuencias de DNA denominadas *mdr1* y *mdr2*, observándose que la correspondiente a *mdr1* fue amplificada en todas las sublíneas KB, mientras que la secuencia de *mdr2* sólo fue amplificada en algunas de ellas(67),

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

Dos grupos de investigadores dirigidos por Chen y Ueda(27,87), encontraron que la secuencia *mdr1* es un transcrito completo del gene *mdr1*, presentándose una gran homología entre esta secuencia y la secuencia *mdr* de ratón así como la secuencia que codifica para la glucoproteína-P en el hamster(14)

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

- a.) La fuente inicial de DNA son células conocidas que presentan una elevada resistencia a múltiples fármacos y que se sabe expresan en forma aumentada glucoproteína-P. Entre las células usadas se encuentran: CH^RC5, KB, DC-3F/VCR-d-5L, LZ.

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

Diversos estudios han demostrado que la transfección de las células sensibles con DNA proveniente de células resistentes a múltiples fármacos, da como resultado la expresión de dicha resistencia en las células receptoras(30,32,42,75,84).

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína-P, fue posible demostrar que la transferencia de resistencia, mediada por DNA, está asociada a la expresión aumentada de la glucoproteína-P.

En 1987, Deuchars y col. (32), efectuaron un estudio en el que las células de ratón(LTA) sensibles fueron transfectadas con DNA proveniente de células resistentes de hamster(CH^RCS), encontrándose que en todas las células transfectadas se detectaron secuencias que codifican para la glucoproteína-P de hamster, mientras que con anterioridad no presentaban amplificación de secuencias para la glucoproteína de la misma especie(ratón).

A partir de que todas las células transfectadas muestran una expresión aumentada de glucoproteína, se sugiere que las secuencias para esta proteína fueron transfectadas y expresadas en las células receptoras.

Esto apoya la hipótesis de que para que se presente la resistencia a múltiples fármacos es necesaria la expresión de la glucoproteína-P(32,42,75).

Es evidente que todos los estudios realizados para aislar los genes que están asociados con la resistencia a múltiples fármacos, dirigen hacia el gene de la glucoproteína-P, corroborándose que se trata de una molécula conservada a través de las especies y que su expresión aumentada es la alteración bioquímica más frecuentemente encontrada en las células resistentes a múltiples fármacos.

Mediante estudios citogenéticos se ha encontrado que en las células de hamster, la resistencia a múltiples fármacos está asociada a la amplificación genética manifestada citológicamente me-

diante la presencia de regiones cromosómicas teñidas homogéneamente (HSR) y de cromosomas dobles pequeños (d mins), estos últimos (cromosomas dobles) aparecen como pequeñas estructuras esféricas en pares.

Presumiblemente las condiciones de cultivo seleccionan a las células tumorales para presentar cromosomas dobles o regiones cromosómicas teñidas homogéneamente ya que los trabajos realizados en células resistentes han demostrado que en ausencia del fármaco, los cromosomas dobles se pierden, mientras que las regiones cromosómicas teñidas homogéneamente son retenidas en las células (81).

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

No obstante que los cromosomas dobles y las regiones teñidas homogéneamente son detectados predominantemente en células cancerosas que presentan resistencia, en algunas ocasiones también se presentan en células cancerosas antes de iniciar la quimioterapia (13).

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

Tabla 2.

EVIDENCIAS CITOLÓGICAS DE LA AMPLIFICACION GENETICA EN LAS CELULAS RESISTENTES A MULTIPLES FARMACOS¹⁴

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

Tabla 2.

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

Línea celular/Fármaco	Evidencia citológica de la amplificación genética	Comentario
Línea celular SEMA de tumor murino:		
Actinomocina D	d mins, HSR	
Colchicina	d mins	
Vincristina	d mins	
Actinomicina D	d mins	Pérdida de d mins en células revertantes
Carcinoma humano (KB):		
Colchicina	d mins	d mins ausentes en células revertantes
Adriamicina	d mins	
Vinblastina	d mins	
Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)		
Vincristina	d mins	Amplificación de genes de la glucoproteína-P
Cáncer de mama humano (MCF-7)		
Adriamicina	HSR	Amplificación de genes de la glucoproteína-P

HSR: Regiones cromosómicas teñidas homogéneamente.

d mins: Cromosomas dobles pequeños.

IDENTIFICACION DE TRANSCRITOS CORRESPONDIENTES A LA GLUCOPROTEINA-P

En todas las líneas celulares examinadas a la fecha, el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos está asociada a un elevado contenido de RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P, cuyo tamaño estimado es de 4.5-5 kilobases, observándose también aunque en forma minoritaria la presencia de otros transcritos de 2-2.3 y de 10.5 kilobases(42,87).

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

En 1987, Fojo y col.(34), realizaron un estudio para determinar la transcripción del RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P en diferentes tejidos humanos tumorales, encontrando que existe una marcada diferencia en la transcripción de la molécula entre ellos(hígado, pulmón, recto, riñón, colon y glándulas adrenales).

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

Se encontró un menor contenido en pulmón, hígado, colon y recto; y un estudio posterior(14) de el contenido de glucoproteína-P en tejidos humanos normales, reveló que se presenta un menor contenido de esta molécula en los tejidos normales en comparación con los tejidos tumorales, observándose además una localización específica de la glucoproteína(superficie celular).

En las células sensibles se ha detectado un nivel de RNAm de la fracción peptídica de la glucoproteína-P muy reducido(88). Para detectarlo se ha aislado y estudiado el cDNA que corresponde a los transcritos de glucoproteína-P de células sensibles sugiriendo un

hallazgo importante: La glucoproteína-P es codificada por una familia de genes denominados genes mdr.

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

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

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

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

De un modo similar, el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos en las células humanas (CEM-VLB) y de ratón (ECH^R) está asociado con la amplificación de una serie de segmentos de DNA reconocidos por el fragmento pCHP1(14).

En los estudios realizados por De Bruijn y col. en 1986(31), se presenta un mismo patrón de amplificación diferencial de segmentos de DNA entre células obtenidas en forma independiente, por lo que es

probable que los segmentos que son amplificados en diferente grado, correspondan a diferentes miembros de la familia de genes de la fracción peptídica de la glucoproteína-P.

Sin embargo, el patrón de amplificación no puede predecirse en base al fármaco usado, ya que al aislar en forma independiente células DC-3F de hamster, usando vincristina como fármaco de selección, se observan diferentes patrones de amplificación de las secuencias de la proteína; mientras que en otro grupo de células DC-3F seleccionadas con tres fármacos diferentes, se observa el mismo patrón de amplificación en todas ellas(13,14).

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

C O N C L U S I O N

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

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

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

Se ha observado que las células resistentes a múltiples fármacos presentan diversos cambios entre los que se encuentran la alteración en la actividad de algunas enzimas y en la presencia de proteínas de diferentes masas moleculares; sin embargo la alteración que se presenta con mayor frecuencia en dichas células, es la expresión aumentada de una glucoproteína de superficie de elevada masa molecular denominada glucoproteína-P.

Se sugiere que esta glucoproteína está asociada a la baja acumulación intracelular de los fármacos observada en las células resistentes a múltiples agentes antineoplásicos, por lo que se ha hecho énfasis en el estudio de esta molécula.

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

1. La glucoproteína-P forma un canal en la membrana plasmática a través del cual los fármacos son transportados hacia el exterior de la célula.
2. Una proteína (diferente a la glucoproteína-P) que se une al fármaco es transportada hacia el exterior celular por medio de la glucoproteína-P que funciona como bomba de excreción.

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

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

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

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

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

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

Es importante hacer énfasis en la necesidad de nuevos productos que puedan ser más eficientes.

Además para tener una mayor información sobre el problema de la resistencia a múltiples fármacos en la célula tumoral, son necesarios estudios de regulación metabólica y de los mecanismos de acción de los fármacos en la misma.

BIBLIOGRAFIA

1. Akiyama, S.I., Cornwell, M.M., Kuwano, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photo-affinity labeling of P-glycoprotein by vinblastine analog. *Molec. Pharmacol.*, 33:144-147, 1988.
2. Alitalo, K. Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. *TIBS* May pp. 194-197, 1985.
3. Ames, L., Ferro, G. The basis of multidrug resistance in mammalian cells: Homology with bacterial transporters. *Cell*, 47:323-324, 1986.
4. Arsenault, A.L., Ling, V., Kartner, N. Altered plasma membrane ultra-structure in multidrug-resistant cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 938:315-321, 1988.
5. Avers, J., Ch. *Biología celular*, segunda edición ed. Interamericana pp. 498-506, México 1981.
6. Bagshawe, L.K. Reversed-role chemotherapy for resistant cancer. *The Lancet*, 4:778-781, 1986.
7. Bar Sagi, D., Feramisco, R.J. Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, 42:841-848, 1985.
8. Bech-Hansen, N.T., Till, J.E., Ling, V. Pleiotropic phenotype of colchicine resistance CHO cells: Cross resistance and collateral sensitivity. *J. Cell. Physiol.*, 88:23-32, 1976.
9. Beck, T.W. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 36:2879-2887, 1987.
10. Beck, T.W., Cirtain, C.M., Lefko, L.J. Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblast. *Mol. Pharmacol.*, 24:485-492, 1983.

11. Bertino, R.J., Carman, D.M., Weiner, L.H., Cashmore, A., Moroson, A.B., Srimatkandada, S., Schornagel, H.J., Medina, D.W., Dude, K.S. Gene amplification and altered enzymes as mechanisms for the development of drug resistance. *Cancer Treat. Rep.*, 67:901-904, 1983.
12. Bevan, A.J. *Fundamentos de farmacología*. segunda edición ed. Harla Harper & Row Latinoamericana pp.694-705, México 1982.
13. Biedler, J.L., Peterson, R.H.F. Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents, pp. 453-482, Academic press N.Y. 1981.
14. Bradley, G., Juranka, F.P., Ling, V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 948:87-128, 1988.
15. Burns, C.P., Luttenegger, G.D., Dudley, T.D., Buettner, R.J., Spector, A.A. Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and morphotransport in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res.*, 39:1726-1732, 1979.
16. Carlsen, A.S., Till, E.J., Ling, V. Modulation of drug permeability in chinese hamster ovary cells: Possible role for phosphorylation of surface glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 467:238-250, 1977.
17. Carter, K.S. Some thoughts on resistance to cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.*, 11:3-7, Suppl. A, 1984.
18. Cass, E.C., Wierczorek, J.A., Lynch, A.M., Hindenburg, A., Beck, T.W., Sheinin, H. Effect of duration of exposure to verapamil on vincristine activity against multidrug-resistant leukemic cell lines. *Cancer Res.*, 49:5798-5804, 1989.
19. Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, H.I. Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells.

J. Biol. Chem., 261:7921-7928, 1986.

20. Cornwell, M.M., Safa, R.A., Felsted, L.R., Gottesman, M.M., Pastan, I. Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150-170 KDa protein detected by photoaffinity labeling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83:3847-3850, 1985.
21. Cowan, H.K., Batist, G., Tulpule, A., Sinha, K.B., Myer, E.C. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83:9328-9332, 1986.
22. Croop, M.J., Guild, C.B., Gros, P., Housman, E.D. Genetics of multidrug resistance: Relationship of cloned gene to the complete multidrug resistant phenotype. Cancer Res., 47:5982-5988, 1987.
23. Croop, M.J. Perspectives in cancer research. Cancer Res., 44:3643-3653, 1984.
24. Curt, A.G., Clendeninn, A., Chabner, A.B. Drug resistance in cancer. Cancer Treat. Rep., 68:87-99, 1984.
25. Chabner, A.B., Gottesman, M.M., William, G.F. Foundation think tank on multidrug resistance in cancer chemotherapy. J. Natl. Cancer Inst., 80:391-394, 1988.
26. Chabner, A.B., Myers, E.C. Clinical Pharmacology of cancer chemotherapy. In De Vita Jr., T.V. Cancer principles & practice of oncology. ed. J.B. Lippincot Co. USA pp.156-197, 1982.
27. Chen, J.C., Chin, E.J., Ueda, K., Clark, P.D., Gottesman, M.M., Roninson, B.I. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell, 47:381-389, 1986.

28. Dalton, S.W., Grogan, M.T., Meltzer, S.P., Scheper, J.R., Durie, M.G.B., Taylor, W.C., Miller, P.T., Salmon, E.S. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: Detection of P-Glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J.Clin.Oncol.*, 7:415-424, 1989.
29. Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. *Cancer in molecular biology* Scientific American Books Inc. New York pp.1035-1080, 1986.
30. Debenham, G.P., Kartner, N., Siminovitch, L., Riordan, R.J., Ling, V. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol.Cell.Biol.*, 2:881-889, 1982.
31. De Bruijn, M.H.L., Van der Bliek, A.M., Biedler, J.L., Borst, P. Differential amplification and disproportionate expression of five genes in three multidrug-resistant chinese hamster lung cell lines. *Mol.Cell.Biol.*, 6:4717-4722, 1986.
32. Deuchars, K.L., Du, R.P., Evernden, P., Kartner, D., Van der Bliek, A.M., Ling, V. Expression of hamster P-glycoprotein and multidrug resistance in mouse LTA cells. *Mol.Cell.Biol.*, 7:718-724, 1987.
33. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., Waterfield, D.M. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307:521-527, 1984.
34. Fojo, T.A., Ueda, K., Slamon, J.D., Poplack, G.D., Gottesman, M.M., Pastan, I. Expression of multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 84:265-269, 1987.
35. Fojo, T.A., Akiyama, I.C., Gottesman, M.M., Pastan, I. Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 45:3002-3007, 1985.

36. Gerlanck, H.J., Endicott, A.J., Juranka, F.P., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, L.K., Ling, V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. *Nature*, 324:485-489, 1986.
37. Goldie, H.J., Coldman, J.A. The genetic origin of drug resistance in neoplasms: Implication for systemic therapy. *Cancer Res.*, 44: 3643-3653, 1984.
38. Goldie, H.J., Coldman, J.A. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treat. Rep.*, 67: 923-931, 1983.
39. Gosland, P.M., Lum, L.B., Sikic, I.B. Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Res.*, 49:6901-6905, 1989.
40. Gottesman, M.M., Pastan, I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.*, 263:12163-12166, 1988.
41. Greenstein, P.J. *Biochemistry of cancer*. Academic Press Inc. Pub. New York pp. 327-365, 1954.
42. Gros, P., Croop, J., Housman, D. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47:371-380, 1986.
43. Hamada, H., Hagiwara, K. I., Tsuruo, T. Phosphorylation of the M_r 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: Effects of verapamil, trifluoperazine and phobol esters. *Cancer Res.*, 47:2860-2865, 1987.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

44. Haskell, M.C. Cancer Treatment second edition W.B. Saunders Co. pp. 21-42, 1985.
45. Heldin, H.C. Subversion of growth regulatory pathways in malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* 907:220, 1987.
46. Hofslie, E., Meyer, N.J. Reversal of drug resistance by erythromycin: Erythromycin increases the accumulation of actinomycin D and doxorubicin in multidrug-resistant cells. *Int. J. Cancer*, 44:149-154, 1989.
47. Hunter, T. Oncogenes and growth control. *TIBS*, 10:275-280, 1985.
48. Hunter, T. The proteins of oncogenes. *Sci. Amer.*, 251:60-69, 1984.
49. Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y., Johnson, K.R. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.*, 39:2200-2203, 1979.
50. Jacalyn, H.P. Oncogenes, Growth factors and hematopoietic cell transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 989:189, 1989.
51. Janis, A.R., Scriabine, A. Sites of action of Ca^{2+} channel inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 32:2499-2507, 1983.
52. Johnson, A., Heldin, Ch., Wasteson, A., Wastermark, K.B., Deul, T.F., Huang, J.S., Seeburg, P.H., Gray, A. The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3:921-928, 1984.
53. Kartner, N., Shales, M., Riordan, J.R., Ling, V. Daunorubicin-resistant chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 43:4413-4419, 1983.

54. Kolata, G. Why do cancer cells resist drugs?
Science, 231:220-221, 1986.
55. Kramer, A.R., Zahane, J., Kim, G. Role of the glutathione redox cycle in acquired and the novo multidrug resistance. Science, 241: 694-696, 1988.
56. Larsen, L.F., Vincenzi, F.F. Calcium transport across the plasma membrane: Stimulation by calmodulin. Science, 204:306-308, 1979.
57. Marx, L.J. Drug resistance of cancer cells probed.
Science, 234:818-820, 1986.
58. Mihich, E. First annual Pezcoller symposium: Drug resistance-Mechanism and reversal. Cancer Res., 49:7168-7171, 1989.
59. Mellado, W., Horwitz, B.S. Phosphorylation of the multidrug-resistance associated glycoprotein. Biochemistry, 26:6900-6904, 1987.
60. Meyers, B.M., Rittman, L., O'Brien, P.J., Safa, R.A. Characterization of monoclonal antibodies recognizing a 180,000 P-glycoprotein. Cancer Res., 49:3209-3214, 1989.
61. Meyers, B.M., Schneider, A.K., Spengler, A.B., Chang, D.T., Biedler, L.-J. Sorcin (V19), a soluble acidic calcium-binding protein overproduced in multidrug-resistant cells. Biochem. Pharmacol., 36:2373-2380, 1987.
62. Müller, R. Proto-oncogenes and differentiation. TIBS, 11-March, pp.129-132, 1986.
63. Müller, R., Curran, T., Müller, D., Guilbert, L. Induction of c-fos during myelocytic differentiation and macrophage proliferation. Nature, 314:546-548, 1985.

64. Müller, R., Verma, I.M. Expression of cellular oncogenes. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 112:73-115,1984.
65. Nooter, K., Sonneveld, P., Oostrum, R., Herweijer, , Magenbeek, T., Valerio, D. Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporin-A. *Int.J.Cancer*, 45:263-268,1990.
66. Ramu, A., Glaubiger, D., Joshi, A. Plasma mambrane lipid structural order in doxorubicin-sensitive and-resistant P388 cells. *Cancer Res.*, 43:5533-5537,1983.
67. Roninson, B.I., Chin, E.J., Choi, K., Housman, E.D., Fojo, A., Shen, W.D., Gottesman, M.M., Pastan, I. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 83:4538-4542,1986.
68. Rothenberg, L.M., Mickley, A.L., Cole, E.D., Balis, M.F., Tsuruo, T., Poplack, G.D., Fojo, T.A. Expression of *mdr-1/P-170* Gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 74:1388-1395,1989.
69. Sachs, L. Growth, differentiation and the reversal of malignancy. *Sci.Am.*, 254:30-37,1986.
70. Schneider, M.B., Efferth, Th., Kaufman, M., Mattern, J. and Volm, M. P-Glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. *Br.J.Cancer*, 60:815-818,1989.
71. Schurr, E., Raymond, N., Bell, C.J., Gros, P. Characterization of the multidrug resistance protein expressed in cell clones stably transfected with the mouse *mdr1* cDNA. *Cancer Res.*, 49:2729-2734,1989.

72. Scotto, W.K., Biedler, L.J., Melera, W.P. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science*, 232:751-755, 1986.
73. Sehested, M., Skovsgaard, T., Roed, H. The carboxylic ionophore monensin inhibits active drug efflux and modulates in vitro resistance in daunorubicin resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.*, 37:3305-3310, 1988.
74. Shen, W.D., Pastan, I., Gottesman, M.M. In situ hybridization analysis of acquisition and loss of the human multidrug-resistance gene. *Cancer Res.*, 48:4334-4339, 1988.
75. Shen, W.D., Fojo, A., Chin, E.J., Roninson, B.I., Richert, N., Pastan, I., Gottesman, M.M. Human multidrug-resistant cell lines: Increased *mdr1* expression can precede gene amplification, *Science*, 232:643-645, 1986.
76. Siefried, M.J., Burkes, G.T., Tritton, R.T. Cellular transport of anthracyclines by passive diffusion. *Biochem. Pharmacol.*, 34:593-598, 1985.
77. Silberman, H.M., Boersma, M.W., Janssen, W.L.A., Scheper, J.L., Herweijer, H., Nooter, K. Effects of cyclosporin A and verapamil on the intracellular daunorubicin accumulation in chinese hamster ovary cells with increasing levels of drug-resistance. *Int. J. Cancer*, 44:722-726, 1989.
78. Skovsgaard, T. Carrier-mediated transport of daunorubicin, adriamycin and rubidazone in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.*, 27:1221-1227, 1978.
79. Skovsgaard, T. Transport and binding of daunorubicin, adriamycin, and rubidazone in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.*, 26:215-222, 1977.

80. Stark, R.G. Progress in understanding multidrug resistance. *Nature*, 324:407-408, 1986.
81. Stark, R.G. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.*, 53:447-491, 1984.
82. Stites, P.D., Stobo, D.J., Fudenberg, H.M., Wells, V.J. Inmunología básica y clínica. Quinta edición, editorial El Manual Moderno, pp.226-244, 1985.
83. Stoclet, C.J. Calmodulin: An ubiquitous protein which regulates calcium-dependent cellular functions and calcium movements. *Biochem. Pharmacol.*, 30:1723-1729, 1981.
84. Sugimoto, Y., Tsuruo, T. DNA-mediated transfer and cloning of a human multidrug-resistant gene of adriamycin-resistant myelogenous leukemia K562. *Cancer Res.*, 47:2620-2625, 1987.
85. Tsuruo, T., Kawabata, H., Nagumo, H., Kitatani, Y., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. Potentiation of antitumor agents by calcium channel blockers with special reference to cross-resistance patterns. *Cancer Chemoth. Pharmacol.*, 15:16-19, 1985.
86. Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.*, 42:4730-4733, 1982.
87. Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I., Roninson, B.I., Ling, V., Riordan, R.J. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance codes for P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 141:956-962, 1986.

88. Van der Bliek, M.A., Van der Velde-Koerts, T., Ling, V., Borst, P. Overexpression and amplification of five genes in a multi-drug resistant chinese hamster ovary cell line. *Mol. Cell. Biol.*, 6:1671-1678, 1986.
89. Varmus, E.H. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.*, 18:553-612, 1984.
90. Vassilev, M.P., Kanazirska, P.M., Charamella, J.L., Dimitrov, V.N., Tien, H. Changes in calcium channel activity in membranes from cis-Diamminedichloroplatinium(II)-resistant and-sensitive L1210 cells. *Cancer Res.*, 47:519-522, 1987.
91. Vitkauskas, V.G., Canellakis, S.E. Intracellular communication and cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 823:19-34, 1985.
92. Vrignaud, P., Montaudon, D., Galiardi, L.D., Robert, J. Fatty acid composition transport and metabolism in doxorubicin-sensitive and -resistant rat glioblastoma cells. *Cancer Res.*, 46:3258-3261, 1986.
93. Wilson, M.C., Serrano, E.A., Wasley, A., Bogenschutz, P., Shankar, H.A., Wirth, F.D. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*, 244:1184-1186, 1989.
94. Willingham, C.N., Cornwell, M.M., Cardarelli, O.C., Gottesman, M.M., Pastan, I. Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells: Effects of verapamil and others drugs. *Cancer Res.*, 46:5941-5946, 1986.
95. Yanovich, S., Taub, N.R. Differences in daunomycin retention in sensitive and resistant P388 leukemic cells as determined by

digitized video fluorescence microscopy. *Cancer Res.*, 43:4167-4171,1983.

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