

179



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización Molecular de la Topoisomerasa
II-alfa en una Línea Celular Obtenida de Cáncer
de Pulmón Resistente a Quimioterapia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

P R E S E N T A :

RODRIGO REYES LAMOTHE



FACULTAD DE CIENCIAS

UNAM

**DIRECTOR DE TESIS:
M EN IBB RAÚL BARRERA RODRIGUEZ**



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Caracterización molecular de la Topoisomerasa II-alfa
en una línea celular obtenida de cáncer de pulmón resistente
a quimioterapia
realizado por **Rodrigo Reyes Lamothe**
con número de cuenta 9754902-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M en IBB Raúl Barrera Rodríguez *R. Barrera*

Propietario

Dr Victor Manuel Valdes López *(Victor Valdes)*

Propietario

M.en C Bertha Molina Alvarez *Bertha Molina A*

Suplente

Dr Arturo Carlos Becerra Bracho *Arturo Becerra*

Suplente

M en C Emilio Joaquín Córdova Alarcón *Emilio Alarcón*

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
Dra Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLÓGICA

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. A Marta por estar conmigo en todo momento. A Eric por su apoyo. Por su amor y dedicación gracias a los dos.

A mis hermanos Eric y César por preocuparse de mí y por hacer mi vida más divertida.

A Raúl Barrera por la confianza, entusiasmo y por mostrarme el camino a la ciencia.

A Nohelia por su amor, sus esperanzas y por ser como es.

A mi abuela y mis tíos, por su amor y preocupación.

A mis primos Beto, Charlie, Héctor, Nena, Michele, Omar, y los demás, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mis amigos Manolo, Mario, Pepe por su compañía incondicional.

A Irma y Javier por su amistad y por todas esas veces que hemos salido juntos.

A Victor y Valeria por hacer el laboratorio más ameno e interesante.

A Doña Rosita, sin quien este trabajo no hubiera podido realizarse y por ser para mí la presencia materna en el laboratorio.

Mi nombre esta al final de mi camino.

Italo Calvino

ABREVIATURAS

ABC: Del inglés: *ATP-Binding Cassette* (Cassette de Unión a ATP)

cdNA: Cadena de DNA sintetizada a partir de un RNA

CPT: Captothecina

Cs-A: Ciclosporina -A

BCRP: Del inglés: *Breast Cancer Resistance Protein* (Proteína de Resistencia en
Cáncer de Mama)

DXR: Doxorubicina

Gp-P: Glicoproteína-P

Gst: Transferasa de Glutación

MDR: Del inglés: *Multidrug Resistance* (Resistencia Múltiple a Fármacos)

MRP: Del inglés: *Multidrug Resistance Protein* (Proteína de Resistencia Múltiple a
Fármacos)

PCR: Del inglés: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Topo: Topoisomerasa

VM-26: Teniposido

VP-16: Etopósido

ÍNDICE

	Página
Introducción	1
Cáncer de pulmón	1
Clasificación del cáncer de pulmón	2
Terapia contra el cáncer	3
Resistencia Múltiple a Fármacos	5
Mecanismos de Resistencia a Fármacos	
Topoisomerasas	5
top-1	6
top-3	7
top-2	8
top-2 α	9
top-2 β	12
Otros mecanismos	
Glicoproteína-P	12
MRP's	14
Antecedentes	15
Objetivos	17
Hipótesis	17
Material y Métodos	
Obtención de líneas y cultivo celular	18
Ensayo de citotoxicidad	18
Extracción nuclear	19
Determinación de la concentración protéica	19
Ensayo de actividad enzimática de top-2	19
Extracción de RNA	20
Síntesis de cDNA	20
Amplificación por PCR	20
Western Blot	21
Inmunocitoquímica	22
Ensayo de Captación e Inhibición de la expulsión	22

Ensayo de citotoxicidad con inhibición de gp-P por Cs-A.....	22
Resultados y Discusión	24
Conclusión	39
Referencias	40

RESUMEN

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más comunes y una de las causas de muerte más frecuente en todo el mundo. Entre los problemas a los que se enfrenta el tratamiento de ésta neoplasia, sin duda el más importante, es la resistencia múltiple a fármacos. Este fenómeno se caracteriza por la insensibilidad de las células a diversos fármacos utilizados en la quimioterapia, que no necesariamente están relacionados ni estructural ni funcionalmente.

Varios mecanismos de resistencia han sido descritos, entre ellos los cambios en las topoisomerasas. Las topoisomerasas son enzimas esenciales en el metabolismo del DNA, participando activamente en muchos procesos tales como la replicación, transcripción, segregación cromosómica y recombinación. Debido a que son enzimas esenciales en la división celular, las topoisomerasas han sido utilizadas como blanco de antibióticos así como de antineoplásicos. En muchos tumores que presentan resistencia a fármacos, incluidos los del pulmón, la resistencia ha sido directamente asociada con alteraciones de la topoisomerasa-2 α , tanto a nivel protéico (modificaciones post-traduccionales) como a nivel génico (mutaciones puntuales o deleciones).

Con el propósito de conocer más sobre cómo los cambios en topoisomerasa-2 α producen resistencia, se obtuvo una clona celular de cáncer de pulmón (VP-1), capaz de crecer *in vitro* a concentraciones crecientes de etopósido. El objetivo de este trabajo fue caracterizar esta clona celular resistente, con especial atención a los cambios en la topoisomerasa-2 α que pudieran explicar la resistencia al fármaco.

Para determinar el nivel de resistencia a fármacos se utilizó un ensayo de citotoxicidad con MTT, el cual mostró un incremento de alrededor de 2000 veces en la resistencia a etopósido y 100 veces a doxorubicina. Mediante la técnica de RT-PCR con oligos específicos que delimitaban secuencias de 500 nucleótidos se analizó el transcrito de topoisomerasa-2 α . Este análisis evidenció la pérdida de alrededor de 30 nucleótidos en un alelo y 200 nucleótidos en el otro insertados entre los residuos 3021 y 4162 para la línea parental y la clona seleccionada. El estudio de la proteína por western blot no mostró cambios en el peso molecular (170 kDa), mientras que la inmunocitoquímica permitió localizar a la enzima preferentemente en el núcleo de las células. Ensayos de actividad enzimática a partir de extractos nucleares de VP-1, mostraron una reducción con respecto a las células parentales.

Adicionalmente, se analizó mediante RT-PCR la expresión de otros genes relacionados con la resistencia a fármacos. Los resultados mostraron que la clona VP-1 expresa el gen MDR-1, que codifica a la glicoproteína-P (gp-P). Para determinar la contribución de gp-P a la resistencia a etopósido, se realizaron ensayos de citotoxicidad en presencia de un inhibidor de la gp-P (Ciclosporina-A). Los resultados mostraron que gp-P no es directamente responsable de la resistencia a etopósido, apoyando la idea de que la resistencia de VP-1 se relaciona con la alteración de la topoisomerasa-2 α .

En conjunto estos resultados mostraron que la clona celular VP-1 presenta varias alteraciones génicas, que se traducen en la actividad de la proteínas, mismas que pueden ser directamente asociados con la resistencia a etopósido. Adicionalmente, se encontró que las células VP-1 pueden ser un buen modelo para el estudio del fenómeno de resistencia mediado por topoisomerasa-2 α . Estos estudios de este tipo ayudan a tener una mejor comprensión sobre el funcionamiento de la enzima.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracterizan por presentar alteraciones en el control de la división y la muerte celular (1). Estas son adquiridas a través de un proceso de múltiples pasos en los cuales el genoma sufre una serie de mutaciones y regularmente se manifiesta después del transcurso de varios años (2).

El cáncer es una preocupación mundial debido a que tiene una alta incidencia en todos los países del mundo, aún cuando el tipo de cáncer varíe de uno a otro. Así, en todo el mundo durante 1998, se reportaron 4,286,523 nuevos casos de cáncer en hombres y 3,782,881 en mujeres (3), mientras que el número de muertes reportadas causadas por cáncer fue de 2,957,354 en hombres y de 2,225,278 en mujeres (3).

Generalmente, el cáncer es mortal, de tal manera que tan solo en los Estados Unidos, una de cada cuatro muertes es debida al cáncer, ocupando el segundo lugar de las causas de muerte (4). En México los tumores malignos son la segunda causa de muerte (5).

Cáncer de Pulmón

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente en hombres, mientras que en mujeres ocupa el quinto lugar (3). En los Estados Unidos la frecuencia de esta neoplasia es sólo superada por el cáncer de próstata en hombres y en mujeres ocupa el tercer lugar después de los carcinomas de mama y colon (3). La probabilidad de sobrevivir 5 años en pacientes que sufren de cáncer del pulmón después de ser diagnosticado es tan solo del 15.6% en hombres y del 18.3% en mujeres (4).

En México el cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar en mortalidad en hombres y es sólo superado por el cáncer de próstata, mientras que en mujeres ocupa el cuarto lugar, precedido por el carcinoma del cuello uterino, mama y estómago (5).

Estudios realizados en los Estados Unidos, mostraron que desde hace varios años atrás, el número de casos de cáncer de pulmón ha aumentado notablemente, siendo este aumento de más del 400 % para las mujeres entre los años 1960 a 1990 (6).

Dentro de las causas que influyen en la aparición del cáncer pulmonar se encuentra la edad; aunque influye también la etnia y el lugar donde se habita, con un numero doble de casos para hombres en comparación con el de mujeres (7). Otros factores directamente relacionados con el desarrollo de este tipo de cáncer son: los asbestos, radón, arsénico, cromo, níquel, hidrocarburos aromáticos policíclicos, mostazas nitrogenadas, berilio, cadmio, formaldehído; padecimientos como el SIDA, cáncer de cabeza y cuello y otras enfermedades no malignas de pulmón (ejemplos: tuberculosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfisema pulmonar); pero sin lugar a dudas el mas importante de entre todos los factores es el tabaco (8). Tan sólo en los Estados Unidos han muerto, desde 1964 aproximadamente 10 millones de personas por causas atribuidas al tabaquismo; de éstas, 2 millones han sido por cáncer de pulmón (9). Se estima que los hombres fumadores aumentan hasta 22 veces el riesgo de morir por cáncer de pulmón, mientras que en mujeres fumadoras el riesgo aumenta 12 veces (9).

Clasificación del cáncer del pulmón.

Según la Organización Mundial para la Salud (en inglés "*WHO*"), el cáncer de pulmón se clasifica en los siguientes tipos histológicos:

- 1) Carcinoma de células pequeñas (CCP)
- 2) Carcinoma de células no pequeñas (CCNP)
 - a) Carcinoma de células epidermoides.
 - b) Carcinoma de células escamosas.
 - c) Adenocarcinoma.
 - d) Carcinoma de células gigantes.

El CCP tiene su origen en el sistema neuroendócrino, por lo cual presenta marcadores típicos de estos tumores (10). El otro grupo de tumores, clasificados como CCNP, su origen es epitelial, sin embargo para ellos ha sido difícil encontrar un marcador tumoral que ayude en su diagnóstico (8; 10). Dentro de los CCNP, el adenocarcinoma, es el tipo mas frecuente (35%) y se caracteriza por la formación de estructuras glandulares o papilares (10).

En general los tumores del pulmón en fases tempranas son asintomáticos, por lo cual cuando los pacientes acuden a una institución hospitalaria, presentan una etapa clínica avanzada, lo cual hace más difícil su tratamiento.

Terapia contra el Cáncer.

Como en otros tipos de cáncer, hay tres formas principales de tratamiento: La cirugía, la radioterapia, y la quimioterapia; siendo esta última una de las más utilizadas.

Los fármacos más utilizados en quimioterapia incluyen (**Tabla I**):

- a) **Agentes alquilantes:** provocan la unión de un grupo alquilo al DNA y al final causan su rompimiento.
- b) **Antimetabolitos:** compuestos que presentan estructuras semejantes a precursores del metabolismo de los ácidos nucleicos.
- c) **Antibióticos.**
- d) **Alcaloides vegetales.**
- e) **Hormonales:** Son utilizados en ciertos tipos de tumores como el carcinoma de mama y próstata (11)

Debido a que dentro de los principales blancos de los fármacos se encuentran enzimas esenciales en la replicación y síntesis de ácidos nucleicos (**Tabla I**). Estos compuestos ejercen una mayor actividad sobre las células que continuamente se replican, misma que es una característica de las células tumorales.

No obstante, a pesar de ser el tratamiento más efectivo, la quimioterapia presenta algunas desventajas, como el costo, los efectos secundarios y el hecho de que su eficacia no es total. Así, para alcanzar una mayor eficacia es frecuente el uso combinado de fármacos.

La efectividad del tratamiento quimioterapéutico depende de:

- a) Del tipo de cáncer.
- b) Las condiciones biológicas y fisiológicas del paciente.
- c) El grado de avance del tumor.
- d) La presencia de resistencia a los fármacos.

Agentes Alquilantes	Mecloretamina Mefálin Clorambucil Ciclofosfamida Nitrosourea Cis-platino Carboplatino Decarbocina Isofosfamida	DNA	MRP / GST's
Antimetabolitos	Methotrexate 5-Fluorouracilo Araβinosido de citosina 6-Mercaptopurina 6-Thioguanina	Dihidrofolato reductasa Timidilato sintasa Polimerasa α de DNA Síntesis de purinas Síntesis de pirinas	MRP3
Antibióticos	Vincristina Vinblastina Taxol Capectohecina Etoposído Teniposído	Tubulina Tubulina Tubulina Topo I Topo II Topo II	MRP y gp-P gp-P Mutaciones en Topo I, gp-P Mutaciones en Topo II, MRP1, 2 y 3, gp-P Mutaciones en Topo II, MRP1, 2 y 3, gp-P
Alkaloides Vegetales	Bleomicina Plicamicina Doxorubicina Daunorubicina Actinomicina D Mitomicina C	DNA DNA DNA y Topo II DNA y Topo II DNA DNA	MRP1 y 2, gp-P MRP1 y 2, gp-P gp-P

Tabla I_ Algunos de los fármacos más utilizados en la quimioterapia y el mecanismo de resistencia asociado.

Por otra parte, dependiendo de la respuesta a la quimioterapia, las neoplasias pueden ser clasificadas en tres grupos (12): a) aquellas que son muy sensibles y donde la combinación de agentes conduce a una remisión; b) las que son medianamente sensibles a la quimioterapia y donde la combinación de agentes solo prolonga la supervivencia (Ejemplo: el CCP); c) aquellos que resultan ser resistentes a la quimioterapia y aun la combinación de varios fármacos resulta en poco o ningún efecto sobre en la supervivencia (Ejemplo: la mayoría de los tumores sólidos y en especial el cáncer del pulmón).

Resistencia Múltiple a Fármacos.

Posiblemente la mayor preocupación en el estudio del tratamiento del cáncer es la resistencia a la quimioterapia. Algunos tumores son ya resistentes a muchos de los agentes quimioterapéuticos antes de aplicárseles cualquiera de ellos (*resistencia intrínseca*). Mientras que otros tumores presentan una primera etapa de sensibilidad a quimioterapia, pero cuando reinciden muestran no solo resistencia a los fármacos ya empleados, sino

también a otros fármacos a los cuales no habían sido expuestos anteriormente (*resistencia adquirida*). En conjunto a este fenómeno se le conoce como resistencia múltiple a fármacos (*MDR, "Multidrug Resistance"*) (13)

A la resistencia adquirida se le asocian ciertos cambios en la célula como son:

- a) Alteraciones en la permeabilidad de la membrana
- b) Alteraciones en el transporte de las drogas
- c) Cambios en la cinética de las enzimas blanco
- d) Amplificación génica de enzimas y sustratos
- e) Cambios en la susceptibilidad al daño producido por las drogas (14).

Debido a que el fenómeno de resistencia múltiple a fármacos es difícilmente estudiado *in vivo*, gran parte del conocimiento que se tiene acerca del tema se debe a estudios realizados *in vitro*. Las primeras líneas celulares utilizadas para describir el fenómeno de MDR fueron seleccionadas por su resistencia a antraciclinos, colchicina, alcaloides vinca o actinomicina-D (13). Clásicamente la resistencia múltiple a fármacos se define como un fenómeno con las siguientes características: a) resistencia cruzada a varias clases de fármacos no relacionadas de origen natural; b) baja acumulación intracelular del fármaco; c) inhibición de la respuesta por verapamil.

A partir de la primera descripción hecha por Juliano, R.L. y Ling, V. en 1976 (15), varios artículos describen la sobreexpresión de una glicoproteína membranal de 170 kDa llamada glicoproteína P (gp-P), como la responsable del fenómeno de resistencia múltiple. Actualmente se sabe que además de la gp-P, existen otros mecanismos que participan en el fenotipo de resistencia múltiple, tales como otros transportadores transmembranales (MRP, BCRP/MXR), enzimas citoplásmicas (GSTs), y alteraciones en las enzimas blanco de algunos fármacos (Ejemplo: Topoisomerasas, Dehidrogenasa de folato, otras)

MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS

Topoisomerasas

Las topoisomerasas son un grupo de enzimas que están representadas en los tres dominios taxonómicos y que participan en varios procesos celulares en donde se involucra al DNA,

entre los que se incluyen la replicación, transcripción, recombinación, segregación cromosómica y mantenimiento de la estructura cromosómica (16). Su función es la de cambiar el estado topológico del DNA a través del corte y reunión de las cadenas. El mecanismo por medio del cual el DNA es cortado, se lleva a cabo a través de la formación de un enlace transitorio entre un fosfato del DNA y un residuo de tirosina de la proteína (complejo de corte).

Las topoisomerasas pueden cortar una o las dos cadenas de DNA, por lo que se les clasifica primeramente en topoisomerasas de tipo I y de tipo II respectivamente (17).

Las topoisomerasas son el blanco para varios fármacos utilizados en quimioterapia. Estos fármacos pueden actuar como supresores de la actividad enzimática ó a través de la estabilización del enlace fosfodiéster que se forma transitoriamente con el DNA, causando la fragmentación del material nuclear (18). Debido a la ubicuidad de las topoisomerasas estos fármacos se han utilizado como antibióticos y como agentes antineoplásicos (16).

En el humano han sido reportadas al menos cinco topoisomerasas: la topoisomerasa 1 (top-1), topoisomerasa 3 α (top-3 α), topoisomerasa 3 β (top-3 β), topoisomerasa 2 α (top-2 α) y topoisomerasa 2 β (top-2 β) (16).

top-1

Es la única topoisomerasa de tipo I con unión a 3' al DNA. La proteína está formada por 765 residuos de aminoácidos y tiene un peso de 70 kDa. La top-1 es expresada durante todo el ciclo celular (18). Las funciones asociadas a esta enzima incluyen: a) la eliminación de la torsión generada durante la replicación y transcripción que sufre la doble hélice durante su desenrollamiento; b) regulación de la transcripción de ciertos genes, al asociarse con el complejo de TFIID (*Transcription Factor IID*), en una función que no requiere de su actividad catalítica; c) interacción con TRF-4 (*Topo-1 Related Function-4*), una proteína que es homóloga a región amino terminal de la top-1, actuando ambas en la condensación cromosómica; d) acción como cinasa de serina/treonina; y e) posiblemente tiene también un papel en la recombinación (18).

Los fármacos que tienen como blanco a la top-1 pueden ser divididos en: supresores de top-1 (que inhiben la actividad catalítica de la enzima) y venenos de top-1 (que estabilizan los complejos de rompimiento) (18).

top-3

Las top-3 también forman parte de las topoisomerasas de tipo I. En humano hay dos topoisomerasas homólogas a la top-3 de levadura: top-3 α y top-3 β ; ambas, a diferencia de la primera, presentan una región adicional con un número grande de aminoácidos cargados positivamente en el extremo carboxilo-terminal (19; 20), la cual parece no intervenir en la actividad enzimática (21). Las top-3 interactúan solamente con el DNA de cadena sencilla, a diferencia de las top-1 y top-2 que solo lo hacen con DNA de doble cadena (21), y se unen al extremo 5'. La función de las top-3 aún no está definida. Sin embargo, algunos reportes indican que la cantidad de top-3 en las células es mucho menor que la de top-1 y top-2, por lo que no parecen ser buenos blancos para fármacos antineoplásicos (16).

Las diferencias entre ambos tipos de topoisomerasas de tipo I se agrupan en la **Tabla II**.

	Topo I	Topo II
Extremo de unión al DNA	3'	5'
Estado del DNA	Doble cadena	Cadena sencilla
Subunidades	No	α y β
Residuos de aminoácidos	765	976 y 862
Función	Retira torsión durante replicación y transcripción Regulador de transcripción Condensación cromosómica Cinasa de Serina / Treonina	No definida; relacionada con la estabilidad génica

Tabla II _ Algunas características esenciales de las topoisomerasas de tipo I del humano

Top-2

Todas las topoisomerasas de tipo II usan una reacción de transporte de DNA dependiente de ATP, en el cual la enzima lleva a cabo un corte transitorio en una cadena de DNA para permitir el paso a través de ella de la otra cadena, y subsecuentemente vuelve a unir el

DNA cortado (22). A diferencia de las topoisomerasas de tipo I, las topoisomerasas de tipo II de eucariontes, presentan formas diméricas. El mecanismo de acción es el siguiente:

Una primera cadena de DNA (**G**) (**Fig. 1A**) es cortada mediante una trans-esterificación entre un par de residuos de tirosina (uno en cada mitad de la enzima dimérica) y un par de enlaces fosfodiéster, separados por cuatro bases, para formar una unión covalente entre los oxígenos fenólicos de las tirosinas y los grupos fosfato del extremo 5' del DNA cortado (**Fig. 1B**). Los complejos se separan dejando un espacio abierto (**portal G**), lo cual permite el paso de una segunda cadena de DNA (**T**) que es transportada a través del portal G, el cual mas tarde se vuelve a unir mediante otra trans-esterificación entre el grupo hidroxilo 3' y la fosfotirosina, permitiendo la liberación de la enzima (23).

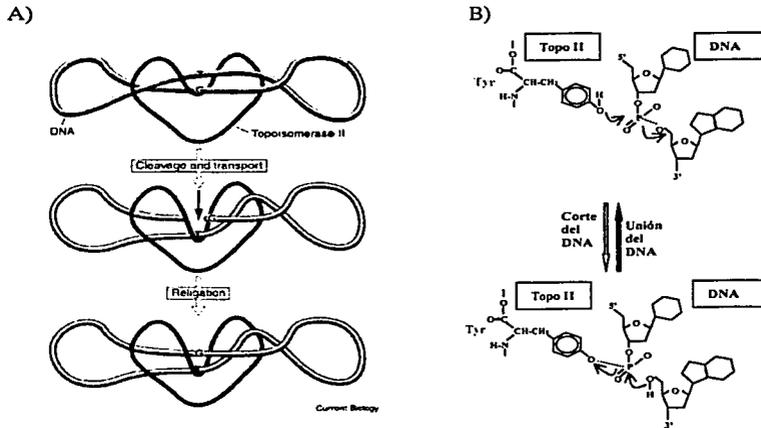


Figura 1. Representación esquemática de la actividad de topoisomerasa II. **A)** Se observa el transporte de la cadena T a través de la cadena G en una molécula de DNA circular (24) **B)** Se presenta la reacción química que se lleva a cabo entre la tirosina de la topoisomerasa II y el fosfato del DNA

Además de llevar a cabo la decatenación, las topoisomerasas de tipo 2 pueden retirar tanto torsión positiva como negativa. En el humano existen dos top-2: top-2 α y top-2 β .

Top-2 α

El gen TOP-2 α se encuentra en el cromosoma 17q21-22, contiene 35 exones y aproximadamente 30 kb (25). Este gen codifica para una proteína de 170 kDa compuesta por 1530 residuos de aminoácidos. La vida media de esta proteína determinada en células HeLa es de 27 hrs, siendo la mayor parte degradada en un lapso de 4 hrs durante la transición de la mitosis a la fase G₁ (26).

La proteína puede ser dividida estructuralmente en tres partes: a) un dominio de ATPasa (del 1 aa – 660 aa); b) el dominio de corte-unión del DNA (del 661 aa – 1200 aa); y c) el extremo carboxilo (desde el 1201 aa) (27). Los primeros dos dominios son homólogos a la girasa B y girasa A de *E. coli* respectivamente, mientras que la cola del carboxilo terminal es el dominio más variable en las enzimas y no guarda relación con otras topoisomerasas.

Los dominios de ATPasa y corte-unión del DNA son autónomos funcionalmente, aunque necesitan una estrecha interacción para que la enzima lleve a cabo su función correctamente (28). Al dominio carboxilo-terminal se le asocia el papel de la localización nuclear de la enzima; varios reportes indican que la señal de localización más fuerte abarca los residuos 1454-1497, una señal más débil se encuentra entre los residuos 1259-1296 (29; 30), además en el COOH-terminal se localizan varias señales de fosforilación (26; 31) (Fig 2).

La top-2 α es la única topoisomerasa fundamental para la sobrevivencia en células de mamífero, debido a que lleva a cabo la condensación y segregación cromosómica y a que esta función es irremplazable (16). Se le asocia además a otros procesos que tienen que llevarse a cabo en el DNA, como la replicación, transcripción, recombinación y reparación (32). La condensación cromosómica parece ser independiente de la actividad catalítica de la enzima (33). La localización nuclear de la top-2 α y su mayor actividad ocurre durante las fases S y G₂ / M del ciclo celular, por lo que esta enzima ha sido considerada como un marcador de proliferación (34). Sin embargo, pequeñas cantidades de la enzima parecen formar parte de los centrosomas, y esta cantidad es independientemente de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula (35).

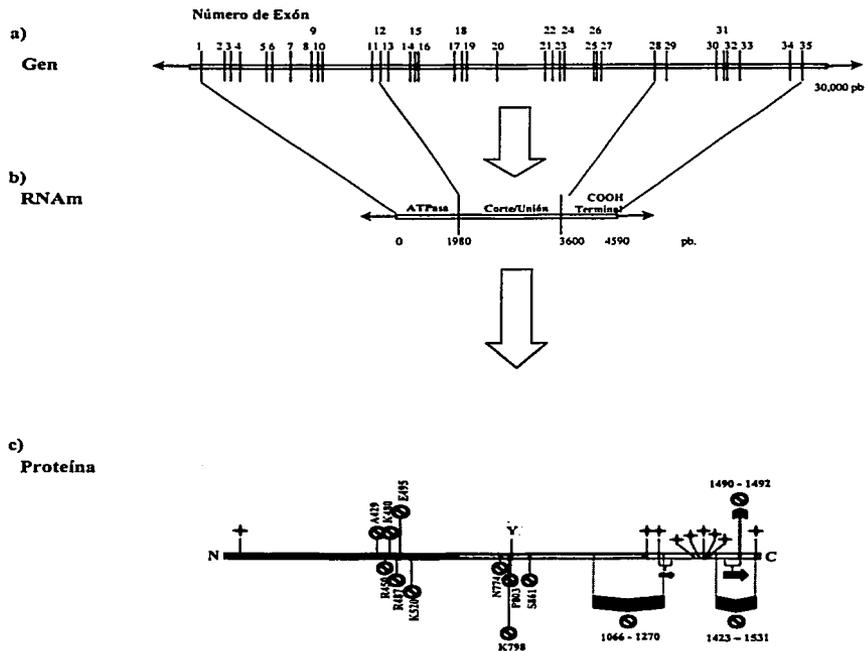


Figura 2. Se muestra una representación del gen, RNAm y proteína de la top-2 α : a: el gen se compone de 35 exones, con un total de 30 kb; las flechas representan las secuencias no transcritas. b: El RNAm dividido en los tres dominios funcionales de la proteína (ATPasa, Corte/Unión del DNA, extremo COOH), las flechas representan las regiones no traducidas. c: Representación de la proteína dividida en los dominios funcionales; el sitio activo (Y-805) está representado por una Y. Se incluyen también la localización de los sitios fosforilables: S29, S1212, S1246, T1342, S1353, S1360, S1376, S1392, S1524 (26), representados por (+); la señal débil de localización nuclear (1259 - 1296) representada por la flecha pequeña, y la señal fuerte de localización nuclear (1454 - 1497) representada por la flecha grande; y algunas de las mutaciones reportadas, relacionadas con la resistencia a venenos de top 2: A429 (38), R450 (39), K480 (40), R487 (41), E495 (41), K520 (40), N774 (42), K798 (43), P803 (44), S861 (45), 1060 - 1270 (46), 1423 - 1531 (47; 48; 49), 1490 - 1492 (50), representados por (⊖)

Como parte del ciclo catalítico mencionado anteriormente, la top-2 α forma un complejo con el DNA, el cual es en condiciones normales reversible y cuya frecuencia en la célula es pequeña. No obstante, bajo algunas condiciones como son el incremento en sales, la alteración de la temperatura, la sustracción de los cationes divalentes o la exposición a ciertos compuestos, es posible que aumente la estabilidad y por tanto la frecuencia de estos complejos (27). La formación del complejo topo-DNA, lleva al rompimiento de la doble cadena cuando enzimas como las helicasas o polimerasas tratan de atravesar por esta región, convirtiendo al corte transitorio en un corte irreversible; si los cortes permanentes aumentan, llegan a un número tal que el evento conduce a la apoptosis (27, 36).

Ya que los niveles de top-2 α aumentan considerablemente en células que se encuentran en fase de proliferación, el tratamiento con fármacos que tienen por blanco las top-2, conlleva la estabilización de complejos de rompimiento y un aumento en el número de fracturas en el DNA. Así, estos fármacos resultan hasta cierto punto selectivos contra las células que continuamente se dividen, tal es el caso de las células tumorales. Esta es una de las razones por las que estos fármacos son ampliamente utilizados en el tratamiento antineoplásico.

Existen por lo menos seis fármacos utilizados en el tratamiento antineoplásico que tienen como blanco las top-2: Doxorubicina, Daunorrubicina, Idarrubicina, Mitoxantrona, Etopósido y Tenipósido (36) (tabla I). Los primeros tres fármacos son antraciclanos, la mitoxantrona es una antraquinona, y los últimos dos son epipodofilotoxinas.

El uso clínico de este tipo de fármacos se ve obstaculizado por tres condiciones: a) un lento crecimiento de las células tumorales, teniendo como consecuencia un bajo contenido de top-2; b) la expulsión de los fármacos por gp-P o MRP-1; y c) mutaciones y alteraciones en la top-2 α (37).

Las mutaciones de top-2 α (Fig 2) pueden dividirse en aquellas que se encuentran:

- a) En el dominio de unión a ATP (residuos 430-490), produciendo una reducción en la actividad catalítica.

- b) Cerca del sitio activo, generando una disminución en la actividad catalítica o interfieren en la formación del complejo.
- c) Truncación del carboxilo terminal, lo cual pueden generar una localización celular errónea o a la inactivación de la top-2 α (51).

top-2 β

El gen de la top-2 β se encuentra en el cromosoma 3p24, contiene 36 exones y tiene una longitud mayor a las 49 kb (25). Codifica para una proteína formada por 1621 residuos de aminoácidos, con un peso de 180 kDa, cuya vida media en células HeLa es mayor a la 40 hrs. (26).

Comparte una similitud secuencial total a nivel de aminoácidos con top-2 α del 68%, teniendo en los tres cuartos amino terminales 78% de similitud, mientras que en el último cuarto del carboxilo terminal solo el 34% (26). Se encuentra tanto en células que se dividen como las que no lo hacen; su expresión no parece estar regulada por el estado proliferativo de la célula en que se encuentra (52). No parece ser esencial para la sobrevivencia celular, pero se ha descrito que participa activamente en el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos (53).

Algunos estudios sugieren que el nivel de sensibilidad a varios fármacos antineoplásicos es diferente para cada isoenzima, siendo la top-2 β más resistente a tenipósido y más sensible a mitoxantrona (26).

La distribución celular de la top-2 β en interfase es nuclear, con parte de ella asociada al nucleolo y durante la mitosis su localización es predominantemente citoplásmica (26).

Las propiedades enzimáticas de la top-2 α y top-2 β son esencialmente indistinguibles (32). Sin embargo, la función biológica y la participación de top-2 β en la quimioterapia no están bien comprendidas.

Otros mecanismos de resistencia múltiple.

Glicoproteína P

La glicoproteína-P esta incluida dentro de una gran superfamilia de proteínas transportadoras llamadas transportadores con casete de unión a ATP (*ABC: ATP Binding*

Cassette) o ATPasas de tráfico, las cuales están representadas en todos los seres vivos. Las proteínas comprendidas en esta superfamilia transportan una gran variedad de sustratos, incluyendo: nutrientes, iones, péptidos, antibióticos y otras toxinas, a través de una variedad de membranas. Están compuestas por dos o tres dominios membranales, cada uno de los cuales puede contener hasta seis hélices transmembranales y por dos dominios citoplásmicos donde se localiza la unión a ATP (54) (Fig. 3).

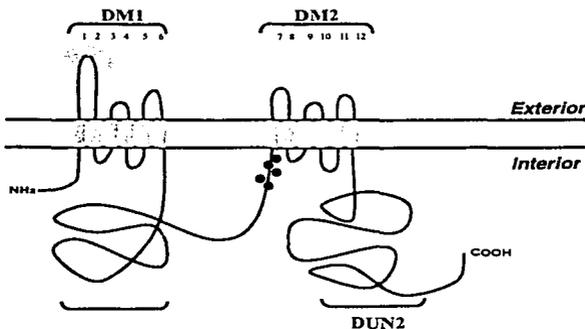


Figura 3. Representación esquemática de la gp-P insertada en la membrana. Los cilindros representan las regiones transmembranales, los círculos representan los sitios de fosforilación, las estrellas representan sitios de unión a azúcares. Dominio transmembranal (DM): Dominio de unión a nucleótidos (DUN).

La gp-P está compuesta por 1281 aminoácidos, y tiene un peso molecular aproximado de 170 kDa. Como otros transportadores ABC, presenta dos dominios membranales y dos citoplásmicos que se alternan, debido a esto, se puede dividir la proteína en dos mitades, las cuales presentan entre sí un 65% de similitud secuencial. Entre estas dos mitades se encuentra la región de unión, la cual presenta secuencias consenso de fosforilación por cinasas dependientes de cAMP y cGMP. Debido a que estas secuencias sólo se encuentran en MDR-1 y no en MDR-3 (gen que codifica para otra proteína muy similar a la gp-P, pero que no se asocia a la resistencia), se les asocia con la resistencia (13). La gp-P es capaz de transportar varias sustancias, entre las cuales se encuentran algunas utilizadas como fármacos en la quimioterapia (**tabla I**).

Además de la temprana correlación entre la expresión de gp-P y la resistencia en los 70's, la capacidad de conferir resistencia a sido demostrada en varios experimentos mediante la transfección del gen MDR-1 en células sensibles, en donde además se demuestra que su sobreexpresión es suficiente para hacer refractarias a las células (55).

El modelo actualmente más aceptado propone que la gp-P intercepta las drogas conforme se mueven a través de la membrana y las transporta de la capa interna a la capa externa de la membrana celular y al medio extracelular (56).

MRPs

El primer miembro de la familia de las MRP fue clonado en 1992 de una línea celular resistente a DXR obtenida de cáncer de pulmón (MRP-1), y posteriormente la familia ha crecido hasta llegar a tener seis miembros (MRP-1-6). Como la gp-P, las MRPs también pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC, pero presentan varias diferencias con respecto a ese transportador, en el caso de MRP-1 sólo se comparte un 18% de identidad secuencial con gp-P(57). La resistencia conferida por MRP-1 está, al igual que gp-P, asociada con un consumo de energía. Estructuralmente MRP-1, MRP-2, MRP-3 y MRP-6 presentan un tercer dominio transmembranal; MRP-4 y MRP-5 son más pequeñas y parecen presentar solo dos dominios transmembranales.

Los sustratos preferidos por MRP-1 son los aniones orgánicos, como por ejemplo las drogas conjugadas a glutatión, glucoronato o sulfato. Mientras que la gp-P presenta poca afinidad por esos compuestos negativamente cargados. Se ha reportado que la transfección de MRP-1 confiere a las células resistencia hacia: Vincristina, Doxorubicina, Daunorrubicina y Etopósido. Sin embargo, no ha sido fácil demostrar la expulsión de estas drogas en células con sobreexpresión de MRP-1. Así mismo, con el uso de vesículas enriquecidas con MRP-1, tampoco se ha podido demostrar la expulsión de Vincristina, Daunorrubicina y Etopósido, por lo que se ha sugerido que se requiere de la presencia de las transferasas de glutatión, especialmente para los alcaloides vinca (54).

Los fármacos a los que se confiere resistencia por parte de los miembros de esta familia están listados en la **tabla I**. Cabe mencionar que MRP-6 no parece contribuir al fenotipo de resistencia múltiple, mientras que MRP-4 y MRP-5 aún cuando parecen ser capaces de transportar fármacos, estos no son contemplados en quimioterapia (58).

ANTECEDENTES

Tradicionalmente el cáncer de pulmón, en especial los CCNP's presenta una gran resistencia a los fármacos utilizados en quimioterapia. Sin embargo, hasta la fecha aún no ha sido posible la identificación de un mecanismo que esté directamente asociado a la resistencia.

Con el propósito de determinar cuales son los mecanismos a través de los cuales las células tumorales de pulmón adquieren la resistencia a fármacos, se han establecido líneas celulares a partir de tumores pulmonares que son mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro*. A través de estos modelos, ha sido posible la caracterización de varios de los mecanismos de resistencia y se ha obtenido mayor información sobre el papel que estos desempeñan en el cáncer del pulmón.

Con la finalidad de estudiar los mecanismo de resistencia mediados por top-2, obtuvimos en nuestro laboratorio varias líneas celulares de tumores de pulmón y clones con resistencia a inhibidores de topoisomerasas. Dentro de las líneas celulares seleccionadas, INER-51 (I-51) fue generada a partir del derrame pleural de un paciente con cáncer de pulmón que no había sido tratado con quimioterapia. Mediante estudios de citología, esta línea fue identificada como un adenocarcinoma poco diferenciado del pulmón. Una caracterización inicial de esta línea celular mostró una alta sensibilidad hacia varios de los fármacos de quimioterapia. La sensibilidad a fármacos resulta mas evidente cuando se compara con una línea celular resistente a inhibidores de top-2 (tabla III).

Un estudio por RT-PCR realizado con el propósito de conocer la expresión de varios genes de resistencia múltiple, mostró que la línea I-51 expresa mensajero para gp-P, top-2 α , top-2 β , pero no MRP-1 y GST- μ . Los resultados de expresión de MDR-1 y top-2 α nuclear fueron corroborados por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-gp-P y anti-top-2 α (datos no mostrados).

A partir de esta línea celular y mediante cultivo a concentraciones crecientes de VP-16 se obtuvo la clona VP-1, la cual fue crecida hasta una concentraciones de 4 μ M de VP-16, sin que se presentara una disminución evidente en la mortalidad celular.

Fármaco	INER-51 IC₅₀ (FM).	INER-37 IC₅₀ (FM).
Etopósido (VP-16)	2.7	40.3
Tenipósido (VM-26)	0.91	14.2
Doxorrubicina (DXR)	6	3
Captothesina (CPT)	0.33	11.6
5-Flourouracilo (5-FU)	0.75	300
Methotrexate (MTX)	1.6	300
Arabinosido de citosina (ARA-C)	0.39	300

Tabla III_ Valores IC₅₀ encontrados de dos líneas celulares de cáncer de pulmón.

OBJETIVO GENERAL

- ◆ Análisis molecular de posibles alteraciones en la enzima topoisomerasa -2α que pudieran estar relacionadas con la resistencia de la clona VP-1 a etopósido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Describir las alteraciones que pudiera presentar la Topoisomerasa- 2α tanto a nivel del transcrito como de proteína.
- ◆ Analizar si existen diferencias en la actividad nuclear y/o localización celular de la enzima.
- ◆ Determinar, si la línea celular presenta un fenotipo de resistencia múltiple a fármacos.
- ◆ Sugerir otros mecanismos que pudieran contribuir a la resistencia a etoposido.

HIPÓTESIS

Debido a la importancia de la top- 2α en el mecanismo de acción del etopósido, es muy probable que la adquisición de un fenotipo de resistencia este asociado con cambios en el gen que codifica para la enzima.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Obtención de líneas y cultivo celular

La línea INER-51 (I-51) fue mantenida con medio RPMI-1640, complementado con 10% de suero fetal bovino, 200 mM de L-glutamina y 100 mM de piruvato de sodio. Las células fueron mantenidas a 37°C, con 5% de CO₂ en un ambiente húmedo.

La línea celular VP-1 fue obtenida a partir de la línea I-51 y fue seleccionada a través del cultivo en concentraciones crecientes de etopósido (VP-16), hasta llegar a 4 µM. La VP-1 fue mantenida en medio RPMI-1640 con una concentración estable de 2µM de etopósido durante todo el estudio. Otras líneas utilizadas fueron: INER-37 (I-37), una línea que proviene de cáncer de pulmón, A-498, proveniente de un cáncer de riñón, ambas cultivadas en RPMI-1640 y HeLa obtenida de un carcinoma epidermoide de cérvix que fue cultivada en medio de cultivo D-MEM completo.

Ensayos de Citotoxicidad

En una placa de 96 pozos se colocaron $5-7 \times 10^3$ células / pozo. En la placa se utilizaron diferentes concentraciones de un fármaco formando un gradiente. Se utilizó una placa por cada tipo de fármaco y línea celular. La concentración utilizada, dependió del tipo de fármaco y el intervalo de análisis incluyó el IC₅₀ (concentración de fármaco a la cual la mitad de las células mueren), el cual fue calculado a través del programa PHARM / PCS 4ª versión.

Durante el ensayo, las células fueron incubadas durante 72 hrs a 37 °C, con 5% de CO₂ en un ambiente húmedo. Al final de este lapso de tiempo, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 20µl de MTT a 4.8 mM. Posteriormente, se incubó durante otras 4 hrs, al término de las cuales se disolvió en 180µl de DMSO (Dimetil Sulfoxido). La intensidad del color se cuantificó por absorbencia a 540 nm en un lector para ELISA.

Los resultados fueron analizados en función de la sobrevivencia celular, tomando como el 100% de viabilidad a aquellas células a las que no se le añadió fármaco.

Extracción Nuclear

De los cultivos celulares, por tripsinización se obtuvieron $2-5 \times 10^6$ células. Las células fueron lavadas dos veces con ASF (amortiguador salino de fosfatos) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM KH_2PO_4 ; pH 7.3) a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas utilizando el amortiguador A (150 mM NaCl, 1 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0.2 mM DTT, 1 mM PMSF) con 0.3% del detergente Tritón X-100. Se lavó después con el mismo amortiguador pero sin detergente, y posteriormente se utilizó una mezcla por partes iguales del amortiguador A con el amortiguador B (50 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). La muestra fue resuspendida en una mezcla de los dos amortiguadores y glicerol al 87% en una relación 1:1 y fue almacenada a 20°C.

Determinación de la concentración de proteína.

Para cuantificar la concentración de proteína se utilizó la técnica Lowry-Folin. Brevemente, se realizó una curva patrón utilizando de 2 a 10 μg de albúmina como referencia y se comparó con dos alícuotas de 2 y 4 μl de las fracciones nucleares anteriormente aisladas. Las diferentes muestras fueron llevadas a un volumen de 50 μl con agua bi-distilada, después se le agregó la solución C, que es el resultado de la mezcla de la solución A (15 mM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_8\text{Na}_2$) y la solución B (0.24 M NaCO_3 , 0.1 M NaOH) en una relación 1:50; la mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100 μl de reactivo de Folin y se incubó por 40 minutos, al término de los cuales se midió la absorbancia a 750 nm.

Ensayo de actividad enzimática de Top-2.

Para determinar la actividad de la top-2 se utilizó la técnica de Jong y cols (59). Se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos nucleares, a las cuales se les adicionó amortiguador TMB (50 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 30 $\mu\text{g/ml}$ de BSA), además de 0.2 μg de DNA del fago $\phi\text{X-174}$ y se llevó a un volumen de 25 μl con agua bi-distilada. La mezcla se incubó a 37° C por 1 hr, al termino de la cual se expuso a 4° C, y se le agregó 2.5 μl de SDS 10%, 2.5 μl de proteinasa-K y 5 μl de amortiguador de carga para

DNA. Cada una de las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%, durante 18 hrs a 23 volts y las bandas fueron reveladas por tinción con Bromuro de etidio y luz UV.

Extracción de RNA

Por cada 1×10^6 células, se utilizó 1 ml de TRIZOL (GIBCO). Se adicionaron 200 μ l de cloroformo y se centrifugó. A la fase acuosa obtenida se le añadieron 500 μ l de isopropanol y se centrifugó nuevamente. La pastilla obtenida, fue lavada con 1 ml de etanol-diethylpirocarbonato (DEPC) al 75 % y se centrifugó una última vez. El botón de RNA total se disolvió en aproximadamente 50 μ l de agua DEPC y se almacenó a 20°C.

Síntesis de cDNA

Se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando 200 U de transcriptasa reversa (*Superscript II RT*, GIBCO) en presencia del amortiguador para la reacción (*Buffer 5x First Strand*, GIBCO), 0.5 mM dNTP's, 10 mM DTT, 0.5 μ g de oligo-dT como cebador y 5 μ g de RNA. La reacción fue terminada exponiendo la mezcla a 70°C por 15 min. Al final se le agregaron 5 U de RNasa H (*USB, Amersham Life Science*) y se incubó 1 min a 40°C para eliminar el RNA remanente. El cDNA se almacenó a -20°C.

Amplificación por PCR

Se amplificó cada uno de los fragmentos utilizando 1 U de Taq- polimerasa (*Taq DNA Polymerase recombinant*, GIBCO) en presencia del amortiguador para la reacción (10x *PCR Buffer*, GIBCO), 0.5 - 1 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTP's, 1 μ l del cDNA previamente sintetizado y un par de oligonucleótidos delimitando la secuencia de interés. Para la amplificación se utilizó una temperatura denaturalizante (94°C), una de apareamiento (tabla IV) y una de amplificación (72°C).

Las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de acrilamida al 4%, durante 1 hr a 70 volts. Los fragmentos de amplificación fueron visualizados con bromuro de etidio y luz UV.

Nombre del Oligo	Gen	Tm (°C)	Tamaño (pb)
DO4/DO5	Top-2 α	55	293
15/16	Top-2 α	55	643
L/R	Top-2 α	63	343
15/R	Top-2 α	55	552
13/16	Top-2 α	55	1141
CF3/RB1	Top-2 α	60	336
Top-1	Top-1	55	223
MRP1-2	MRP-1	60	140
MDR-1-2	MDR-1	55	157
Gst- μ 1-2	GST- μ	60	250
G3PDH1-2	G3PDH	60	110

Tabla IV. Se muestran la temperatura de apareamiento (Tm) utilizada para la PCR, así como el tamaño de cada fragmento de amplificación.

Western blot

Se utilizaron de $2-5 \times 10^6$ células, las cuales fueron resuspendidas en 500 μ l de amortiguador A (100 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM PMSF, 10% Glicerol, 0.1% Nonidet P-40, 0.1% Triton X-100) y fueron sometidas a repetidas congelaciones en nitrógeno líquido para obtener un extracto total.

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE con un gel separador al 8 %. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, a través de la aplicación de una corriente de 30 mA por 1 hr.

La membrana fue bloqueada durante 1 hr con la solución bloqueadora (ASF, 5% de leche descremada, 0.02% de Azida de sodio, 0.02% de Tween 20) y se incubó con el anticuerpo anti-top-2 α (*TopoGen*, dilución 1:1000) a 4°C durante toda la noche. Después, se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con ASF y otro con Tris-Salino (TS) (150 mM NaCl, 50mM Tris-Cl pH 7.5). Posteriormente, se incubó durante una hora a 37°C con el segundo anticuerpo anti-IgG conejo (*DAKO*, dilución 1:500) y se lavó 3 veces TS, cada uno por 5 min. Por último se agregó una solución con DAB (ASF, 0.6 mg/ml de DAB, 0.02 % H₂O₂) para revelar.

Inmunocitoquímica

Cincuenta mil células obtenidas por tripsinización fueron sembradas sobre cubreobjetos y mantenidas en cultivo *in vitro* durante toda la noche. Después de este tiempo, las células fueron fijadas con etanol y secadas a temperatura ambiente.

Previo al inicio de la inmunodetección, cada laminilla fue incubada con 0.3% de H₂O₂ por 30 min. (con el fin de eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas) y lavada con ASF por 5 min. Posteriormente, cada preparación se incubó primero con un suero bloqueador (150 µl suero de cabra, 10 ml ASF) durante 30 min. y luego con un anticuerpo bloqueador (150 µl suero de cabra, 10 ml ASF) durante 30 min. y luego con un anticuerpo anti-top-2α (*TopoGen*, dilución 1:10) a 37 °C por 30 min. Al término de la incubación, se lavó y se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo (*Vectastain*, 1:200) en las mismas condiciones.

Finalmente, las preparaciones fueron incubadas por 30 min con estreptoavidina-peroxidasa (*Vectastain*, 2% reactivo A, 2% reactivo B en PBS; preparado con 30 min de anticipación) y el revelado se realizó con DAB por 10 min.

Ensayo de inhibición de gp-P.

A 600 x 10³ células contenidas en 2 ml de medio sin suero se les agregó Ciclosporina-A (Cs-A, [*Sandimmun-Neoral® Sandoz*]) en una concentración de 5 y 15 µM, y se les incubó a 37 °C por 1 hr. Finalizada la cual, se les agregó Doxorubicina (DXR) a una concentración final de 30 µM y se incubó igualmente a 37 °C por media hora. Después se centrifugó por 5 min. a 1,500 rpm, se lavó dos veces con ASF, se resuspendió en 600 µl de agua destilada, se le llevó a 3 ml con una solución 1:1 de Metanol- HCl (0.2 N). Posteriormente, se centrifugó por 15 min. a 2,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de fluorescencia emitida por la DXR intracelular fue analizada por un fluorómetro a 472 nm de excitación y 580 nm de emisión a un tiempo de lectura de 30 seg.

Ensayo de citotoxicidad con inhibición de gp-P por Ciclosporina-A

En una placa de 96 pozos fueron cosechadas 7 x 10³ células/pozo en 200 µl de RPMI completo y se le agregó Ciclosporina-A (Cs-A) en una concentración final de 5 µM. Las placas fueron preincubadas durante 1 hr. a 37 °C y después se les agregaron los fárr.acos

(VP-16 ó DXR) a las mismas concentraciones utilizadas en los ensayos de citotoxicidad. Las células permanecieron bajo estas condiciones por 24 hr a 37 °C, después de lo cual se determinó la sobrevivencia celular mediante MTT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó la línea celular de cáncer del pulmón denominada VP-1, la cual fue seleccionada por su resistencia a VP-16.

Con la finalidad de determinar si el proceso de selección a VP-16 influyó en el crecimiento de la clona celular, se compararon los patrones de crecimiento de la clona con respecto a las células originales. Las curvas de crecimiento obtenidas mostraron una disminución en la velocidad de crecimiento por parte de la clona VP-1 (Fig. 4), así como un cambio en la morfología celular, dado que incrementaron su tamaño y presentaron una menor adherencia a las cajas de cultivo (Fig. 5).

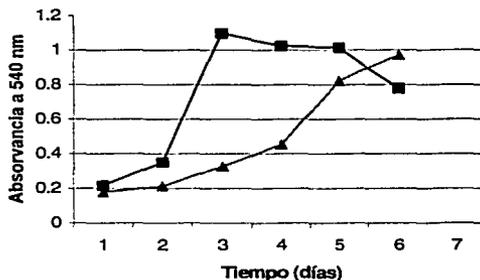


Figura 4. Curva de crecimiento de las líneas celulares de cáncer del pulmón I-51 (■), VP-1 (▲), utilizando la técnica de MTT.

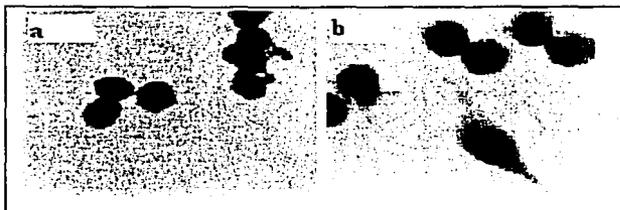


Figura 5. Morfología de las células teñidas con hematoxilina-eosina, para la línea celular I-51 (a) y VP-1 (b). (amplificación de 200x);

Debido a que la línea celular fue seleccionada por el crecimiento en concentraciones crecientes de VP-16, fue fundamental determinar el grado de resistencia a etopósido, en comparación a la línea celular materna I-51. Con este propósito, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad por MTT utilizando distintas concentraciones de VP-16. Los resultados mostraron que la línea seleccionada fue alrededor de 2000 veces más resistente que I-51 (Fig. 6).

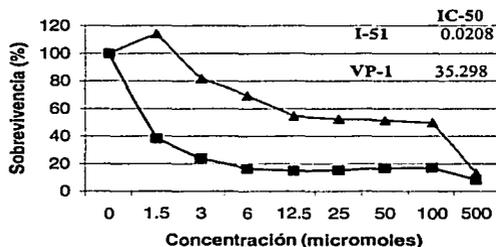
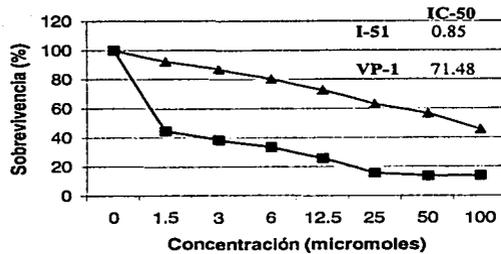


Fig. 6. Curva de citotoxicidad de líneas celulares de pulmón contra etopósido. Línea celular I-51 (■), VP-1 (▲). En la esquina superior se muestra el índice de toxicidad media (IC₅₀) para las dos líneas celulares. Los resultados son el promedio de 4 repeticiones.

La gran resistencia a VP-16 encontrada en VP-1 sugirió que esta línea celular pudo desarrollar una alteración en las topoisomerasas de tipo II, quienes son el blanco de este fármaco

Dado que el VP-16 no es el único fármaco que tiene como blanco a las top-2 y con el fin de caracterizar mejor la resistencia de las células VP-1, se preguntó si la resistencia que presentaba la línea celular se extendía a otros fármacos que tienen como blanco a la top-2. Así, se determinó mediante ensayos de citotoxicidad el grado de sensibilidad a Tenipósido (VM-26), un fármaco estructuralmente muy parecido a VP-16 y a Doxorubicina (DXR), que es diferente tanto estructural como funcionalmente. Los resultados mostraron un incremento en la resistencia a VM-26, sin embargo, el valor de resistencia no fue posible calcularlo debido a la alta sensibilidad de las células I-51. En el caso de DXR, la resistencia se incrementó alrededor de 100 veces (Fig. 7).

a)



b)

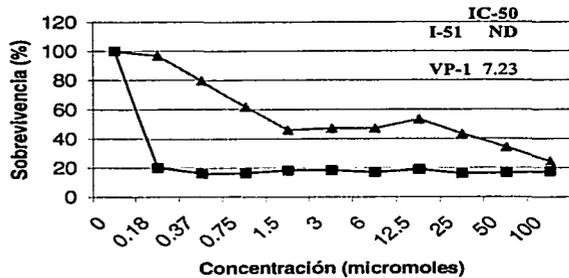


Fig. 7 _ Curvas de citotoxicidad contra diferentes concentraciones de Doxorubicina (a), y Tenipósido (b). Líneas celulares I-51 (■) y VP-1 (▲). En la esquina superior de cada gráfica se muestra el índice de toxicidad media (IC₅₀) para las dos líneas celulares. Para DXR se hicieron 4 repeticiones del experimento, mientras que para VM-26 se hicieron 2.

Con el propósito conocer si la resistencia se extendía a otras topoisomerasas gracias a las funciones y mecanismos que comparten, se estudió también la resistencia a captothecina, fármaco que actúa sobre la top-1. En esta ocasión los resultados encontrados no mostraron diferencias evidentes en los niveles de resistencia entre las dos líneas celulares.

En conjunto los resultados anteriores sugirieron que como consecuencia de la selección por VP-16, la línea celular VP-1 desarrolló al menos un mecanismo de resistencia que le

permite resistir la acción citotóxica de varios fármacos que tienen como característica en común tener como blanco a la top-2 α .

Varios reportes han asociado la resistencia a VP-16 con una alteración tanto cuantitativa como cualitativa de la top-2 α (51), por esta razón, nuestra investigación se encaminó hacia el análisis de la integridad de la top-2 α , tanto al nivel génico como proteínico.

El primer acercamiento fue a través del estudio del mRNA utilizando la técnica de RT-PCR y varios juegos de oligonucleótidos que delimitaron diferentes regiones del gen de top-2 α (tabla IV).

Seguendo la división que se hace de la proteína, el transcrito fue dividido en tres regiones correspondientes (ATPasa, Corte-unión y 3'-terminal, Fig. 2). Para cada una de estas regiones se desarrollo al menos un par de oligonucleótidos. Con esto intentamos determinar si había alteraciones a nivel del transcrito (inserciones y/o deleciones) tan evidentes como para ser detectadas por cambios en el tamaño de los segmentos amplificados.

Cuando se analizó la región que codifica para la ATPasa, no se encontraron alteraciones en el tamaño de los amplicones (Fig. 8). No obstante, cuando se llevó a cabo el análisis de fragmentos localizados en la región de corte-unión o en el 3'-terminal, sí se encontraron alteraciones evidentes en la línea seleccionada (Fig. 8). De forma interesante, éste análisis también evidenció alteraciones para esta región en el mRNA de la línea celular parental I-51 (Fig. 8). En ambos casos, las alteraciones observadas se presentan como múltiples bandas, sin ninguna que correspondiera al tamaño esperado para la región comprendida entre los oligonucleótidos 13/14 (bases 3021-3570).

La ausencia de la banda amplificación del tamaño esperado al utilizar el juego de oligonucleótidos 13/14 podía ser explicado por la alteración en alguna de las secuencias donde son reconocidos los oligonucleótidos. Así, el problema podía encontrarse o en la región de reconocimiento del oligonucleótido 13 ó del 14.

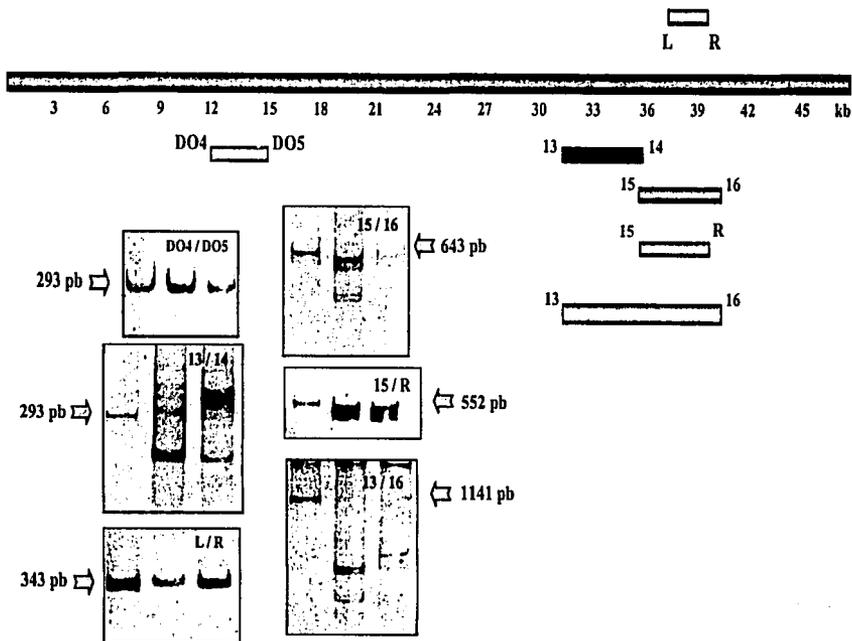


Figura 6_ Se muestra en la parte superior de la figura una representación del transcrito de top-2 α y de las regiones enmarcadas por cada uno de los pares de oligos que fueron utilizados. En la región inferior se muestran los resultados de la amplificación por RT-PCR de cada una de las regiones delimitadas por los oligos. El primer carril de cada una de las fotos presenta el control positivo, el segundo a I-51 y el último a VP-1. Las flechas indican el tamaño esperado.

Con la finalidad de conocer si la región de complementación para el oligonucleótido 13 formaba parte de la alteración, se planeó la amplificación de otro fragmento que involucrara al oligonucleótido 13 pero no al 14. Para esto se utilizó la combinación de los oligonucleótidos 13/16 (1,405 pb). Los resultados mostraron dos bandas para I-51 (alrededor de 450 y 350 pb) y una para VP-1 de mayor peso molecular (alrededor de 500 pb) (Fig. 8). El hecho de que no fueran las únicas bandas, aunado a que el tamaño observado fue aun menor al obtenido cuando se sintetizó la región comprendida entre 15/16 (600 y 400 pb), la cual se encuentra dentro de la secuencia limitada por 13/16, hace pensar que hay una alteración en la región complementaria al oligonucleótido 13. Aunque con estos resultados se puede suponer que la región cercana al reconocimiento del oligonucleótido 13 está alterada, sin embargo, no es posible conocer con exactitud la extensión del daño.

Siguiendo con la caracterización del transcrito, también se realizó otra amplificación utilizando los oligonucleótidos 15/16 (3519 - 4162), los cuales se encuentran al principio de la región 3'-terminal. La amplificación encontrada mostró dos bandas en I-51 (de alrededor de 600 y 400 pb) y una en VP-1 (alrededor de 600 pb), ninguna de las cuales correspondió con el tamaño de la banda esperada (643 pb). El hecho de que haya dos bandas en la línea parental y una en la seleccionada, sugiere la existencia de dos transcritos en I-51 y la predominancia de uno en VP-1 (Fig. 8)

Con la finalidad de delimitar con una mayor precisión la localización de la alteración, se utilizó el juego de oligonucleótidos 15/R (cuya amplificación es 91 pb más corta que 15/16). Este análisis mostró una banda de amplificación aproximadamente 30 pb mas pequeña con respecto al control para ambas líneas celulares (Fig. 8).

En un intento por explicar los resultados hasta aquí obtenidos con la técnica RT-PCR, se planteó una hipótesis que intenta enmarcar las alteraciones que probablemente sufrió el transcrito de la top-2 α (Fig. 9).

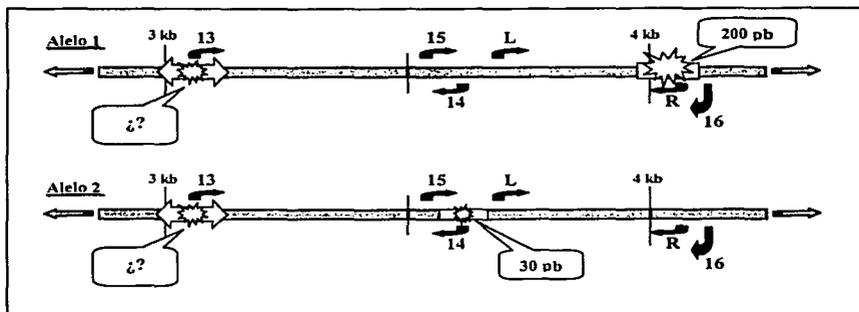


Figura 9 _ Representación esquemática de las posibles alteraciones a nivel del transcrito en la región comprendida entre los oligonucleótidos 13 y 16. La figura muestra los dos alelos. Con flechas se señala la localización de cada oligonucleótido; con el símbolo (⊙) se muestra la posición aproximada de las alteraciones, la cual puede encontrarse dentro de la región clara que la enmarca; dentro de un cuadro se indica la posible extensión de cada una de las alteraciones, y con signos de interrogación se indica aquellas en que aún no se han podido determinar.

Según la hipótesis aquí propuesta, el transcrito de top-2 α (proveniente de los dos alelos y con daños muy parecidos en ambas líneas celulares) presenta al menos tres alteraciones independientes:

a) Cercana a la zona de reconocimiento al oligonucleótido 13.

Los análisis utilizando al oligonucleótido 13 no permitieron observar ninguna banda de amplificación definida, por lo que es muy probable que los dos alelos presenten una alteración en esta zona. El problema es al tratar de definir qué es lo que impide esta amplificación, ya que puede tratarse de: a) un *splicing* alternativo (la secuencia del oligonucleótido se encuentra interrumpida por un intron); b) una delección; o c) puede deberse a mutaciones puntuales. En el caso de mutaciones, tampoco conocemos la extensión de estas, ni su exacta localización.

Un estudio de delecciones sobre posibles sitios importantes para la enzima (propuestos a través de un análisis de secuencia) mostró que en una región comprendida en su mayor parte entre los oligonucleótidos 13/14 (bases 3363-3699), existe un fragmento conservado para la top-2 α (60). La alteración de esta región por delección conduce a la pérdida de la actividad enzimática (60). En esta misma región, se ha sugerido que se encuentra una zona

de dimerización, cuya ausencia conduciría también a la pérdida de la actividad de la enzima (23). El hecho de que haya una disminución en la actividad enzimática puede estar asociado con una resistencia, al disminuirse el número de sitios blancos con los que puede interactuar el fármaco, ya que la enzima debe conservar por lo menos su capacidad de formar el complejo de corte para que el fármaco pueda ser efectivo.

Estas observaciones y el posible daño observado a través del oligo 13, sugieren que VP-1 puede presentar una disminución en la actividad de la top-2 α mayor a la de la célula parental I-51, sin que se presente realmente una pérdida total y permite explicar en parte la disminución de la velocidad de crecimiento de la clona resistente.

b) Un segundo evento localizado entre los oligonucleótidos 15 y L

Los análisis de la región entre los oligonucleótidos 15/16, mostró que es posible que haya una alteración de alrededor de unos 30 pb en uno de los alelos, que es evidenciada por la diferencia con la banda de amplificación del control. Esta alteración se encontró tanto en la línea I-51 como en VP-1, y debido a que tanto la amplificación de la región entre los oligonucleótidos 15/16 y el par 5/R, se logró mapear antes del oligonucleótido L y después del 15; el oligonucleótido 14 puede o no estar alterado.

De esta manera y al igual que con la región comprendida entre los oligonucleótidos 13/14, la zona comprendida por el par 15/L, contiene parte de una secuencia conservada (3363–3699) que al ser retirada conlleva una pérdida de la función de decatenación de la enzima (60).

En esta región de la enzima hay también un sitio de fosforilación (S1212), el cual es hiperfosforilado durante la fase G₂/M, por lo que se le ha relacionado tanto con diferencias en la actividad de la enzima, como en su localización nuclear (26). Para que la enzima sea reconocida por el fármaco necesita estar dentro del núcleo, porque sólo en este sitio ocurre la interacción con el DNA. Si bajo esta condición, solo una pequeña cantidad de enzima penetra al núcleo, el fármaco tendría menos sitios blanco efectivos reconocibles.

c) Un tercer evento cercano a la región de reconocimiento al oligonucleótido R

La última alteración que pudiera estar presente se encuentra cubriendo al oligonucleótido R y sólo parece presentarse en un alelo. Así, se explica como la amplificación del segmento

L/R se encuentra aparentemente bien, ya que nada más se amplifica el alelo que no se encuentra mutado, mientras que 15/16 presenta dos amplicones con una diferencia muy clara en el tamaño. La alteración parece ser una deleción que abarca unos 200 pb, que pueden ir desde antes del oligonucleótido 16 hasta 200 pb antes del inicio del oligonucleótido R.

Una región importante que podría encontrarse en esta zona, es una de las dos señales de localización nuclear (la señal débil de localización nuclear, 1259–1296 aa), que cuando se pierde produce una reducción en la cantidad de top-2 α nuclear (29; 30).

También se localizan en esta región varias sitios de fosforilación los cuales son hiperfosforilados independientemente al ciclo celular (T1342, S1353, S1360, S1376) (26; 62). Estos podrían participar principalmente tanto en la localización nuclear debido a la cercanía con la señal de localización nuclear débil, como en regular la actividad de la enzima.

Además de las cinasas que actúan sobre la top-2 α (PKC, P34^{cdc2}, MAPK, CKII), recientemente se ha encontrado que la enzima interactúa con varias proteínas las cuales modifican su actividad. Tal es el caso de la proteína del retinoblastoma (rb) y el supresor de tumores p53 (63; 64). En el último caso, la interacción ha sido demostrada que ocurre en el extremo COOH de la enzima (65). De esta manera, otra forma en la que podría verse afectada la función de la top-2 α es a través de un cambio en la interacción con las proteínas.

Los resultados con la técnica de RT-PCR evidenciaron una alteración en el gen de la top-2 α para ambas líneas celulares, sin diferencias claras entre ambas. Las alteraciones encontradas parecen abarcar 500 pb de la región terminal del dominio de corte unión y una zona no definida del dominio 3'-terminal. Las consecuencias que podría traer dentro de la función celular de la enzima pueden ir desde la pérdida total de la actividad enzimática, hasta eventos como la disminución de su actividad, la localización citoplásmica (y por tanto no funcional), la pérdida de su regulación durante el ciclo celular; todo lo cual puede contribuir a la resistencia a etopósido.

Conociendo que el gen de top-2 α de VP-1 estaba alterado, se propuso estudiar la proteína. El análisis por RT-PCR sugirió que los daños que fueron observados en el transcrito podrían afectar la actividad enzimática, la cual ya anteriormente ha sido relacionada a la resistencia (59). Para estudiar esta posibilidad, se analizó la actividad enzimática nuclear de la top-2 utilizando como sustrato el DNA del fago ϕ X-174. Los resultados muestran diferencias evidentes entre una línea celular y la línea parental I-51, siendo para VP-1 menor la actividad (Fig. 10).

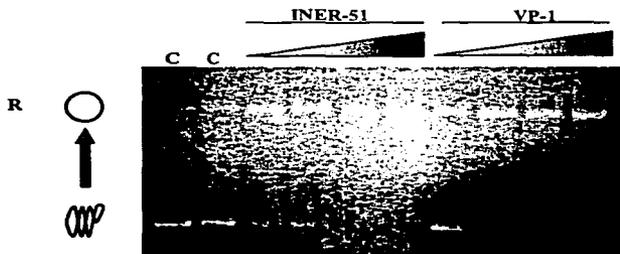


Figura 10_ Actividad de relajamiento de topoisomerasa II sobre el DNA ϕ -X174. Se obtuvieron extractos nucleares de las líneas celulares I-51 y VP-1. El carril 1 control (C-) contiene únicamente sustrato (ϕ -X174), el carril 2 (C+) contiene sustrato con extracto nuclear de la célula control (HeLa). La concentración del sustrato en las reacciones fue constante, mientras que la del extracto nuclear varió (1, 2, 3 y 4 μ g para ambas líneas). Las diferentes concentraciones están ordenadas de derecha a izquierda crecientemente para cada línea celular. Relajado (R); Superenrollado (SE).

Los resultados de actividad enzimática evidenciaron una disminución en la actividad de la enzima de las células VP-1 en comparación con las células I-51. La actividad disminuida de la top-2 podría ser el resultado de la alteración en la región de corte/unión o una consecuencia de la disminución del número de moléculas de la enzima dentro del núcleo y por tanto consecuencia de la alteración de la señal de la localización nuclear.

Debido a que los resultados del análisis del cDNA sugirieron una deleción relativamente grande en por lo menos uno de los alelos de top-2 α , lo cual en reportes anteriores se ha asociado a la adquisición de la resistencia a fármacos que interactúan con top-2 α (61, 62), y con la finalidad de conocer si en nuestra línea celular había dos proteínas de diferente

tamaño, se realizó un experimento tipo western blot usando un anticuerpo que reconoce los 16 residuos de aminoácido COOH terminales de la proteína.

Los resultados de inmunodetección mostraron de forma interesante una banda única para I-51 y VP-1 con un peso molecular aproximado de 170 kDa, ya que comigró con la top-2 α presente en las células control (HeLa) (Fig. 11).

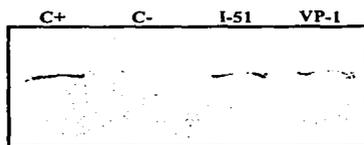


Figura 11. Análisis de extractos totales de proteína por western blot utilizando un anticuerpo que reconoce el extremo COOH de la top-2 α . Carril 1 (C+) corresponde a células HeLa, Carril 2 (C-) células I-37 con una Top-2 α truncada en el COOH-terminal, carril 3 y 4 corresponde a células I-51 y VP-1 respectivamente.

Dos explicaciones pueden plantearse para este resultado: a) que las células VP-1 sintetizan además de una proteína normal (170 kDa), otra enzima alterada. Sin embargo, debido a que el anticuerpo anti-top-2 α (*topoGen*) utilizado en este experimento reconoce una región del extremo carboxilo de la enzima y tomando en cuenta que una probable deleción en esta región, es probable que la enzima alterada no pueda ser detectada con este anticuerpo; b) una segunda explicación puede que se sintetizen dos transcritos, pero uno de ellos no esté siendo traducido a proteína.

Por otra parte, con el fin de conocer si la disminución de la sensibilidad a los fármacos podía ser explicada a través de una disminución en la concentración nuclear de la enzima, se analizó la localización celular de top-2 α mediante la técnica de inmunocitoquímica, utilizando el mismo anticuerpo que en el western blot. Los resultados mostraron en las dos líneas celulares un reconocimiento del anticuerpo por proteína nuclear (Fig. 12). En el caso de VP-1, algunas células parecen presentar reconocimiento del anticuerpo en el citoplasma. Para esta última observación, es importante mencionar que la repercusión de la enzima en el citoplásmica aún no es completamente comprendida, ya que existen evidencias que

sugieren que no influye sobre la resistencia celular si no está acompañada por una disminución nuclear de la enzima (66).

La misma explicación que se obtuvo para el western blot puede aplicarse para el resultado de inmunocitoquímica, ya que es posible que sólo se esté detectando una de las dos proteínas.

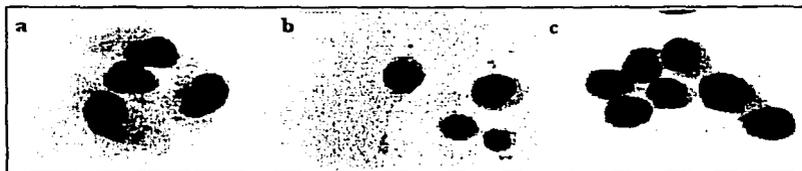


Figura 12. Análisis por inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo que reconoce el extremo COOH de la top-2 α . Se muestran las células HeLa como control positivo (a) y células I-51 (b) y VP-1 (c). Amplificación de 200X.

Por otra parte, la resistencia se asocia también a otras proteínas, por lo cual, se estudió la expresión de top-1, top-2 β y MDR-1, MRP y GST- μ (Fig. 13). Los resultados no mostraron diferencias evidentes en la expresión ni el tamaño de las dos topoisomerasas. En el caso de MRP no se encontró la banda del tamaño esperado, y para GST- μ no se detectó expresión. En MDR-1 la banda fue ligeramente más intensa en VP-1 que en I-51, sugiriendo un aumento en la expresión del gen para esta línea celular.

Ya que la presencia de la gp-P está relacionada con la adquisición de resistencia celular para varios fármacos entre los que se incluyen los aquí utilizados, fue importante descartar si ésta proteína funcionaba como otro mecanismo de resistencia utilizado por VP-1.

Para determinar si la gp-P participaba en la expulsión de los fármacos, se utilizó un ensayo de inhibición de la actividad de gp-P, en donde se midió la expulsión de la DXR (aprovechando su propiedad de fluorescencia), y los cambios en la concentración de ésta debido a la presencia de ciclosporina-A (Cs-A), el cual es un inhibidor de la gp-P.

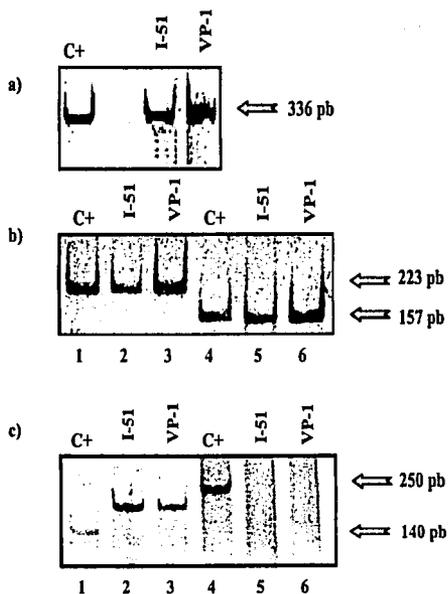


Figura 13. Se muestran los resultados del análisis de la expresión a través de la técnica de RT-PCR para varios genes relacionados con la resistencia. **a.** muestra los resultados de la amplificación del transcrito de topo-2 β ; **b.** carriles 1, 2 y 3 amplificado del transcrito de top-1, carriles 4, 5, 6 MDR-1; **c.** carriles 1, 2 y 3 transcrito de MRP, carriles 4, 5 y 6 Gst- μ .

En la **figura 14** se muestra una clara inhibición en la expulsión del fármaco DXR cuando se incuban las células en presencia de Cs-A. Este experimento mostró que la gp-P participa en la expulsión de los fármacos como DXR en la línea celular VP-1 y explica en parte el aumento en la resistencia a DXR previamente reportado (**Fig. 7a**). Así mismo, este resultado también parece sugerir que gp-P puede participar activamente en la expulsión de otros fármacos como VP-16.

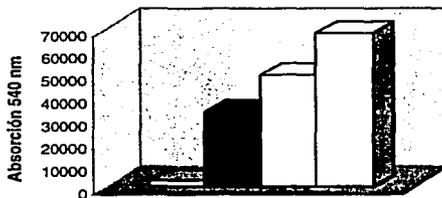


Figura 14. Inhibición de la actividad de gp-P por Cs-A. La columna 1 es VP-1, la columna 2 es VP-1 + 30 μM de DXR, la columna 3 y 4 es VP-1 + 30 μM de DXR + 5 μM ó 15 μM de Cs-A.

Con el propósito de conocer que tan importante era la función de la gp-P en la sobrevivencia celular en presencia tanto de VP-16 como DXR, se realizaron ensayos de citotoxicidad, pero ahora en presencia de Cs-A (**Fig 15**); los resultados mostraron una sensibilización a DXR, pero solo ligero cambio en la resistencia cuando las células fueron expuestas a VP-16.

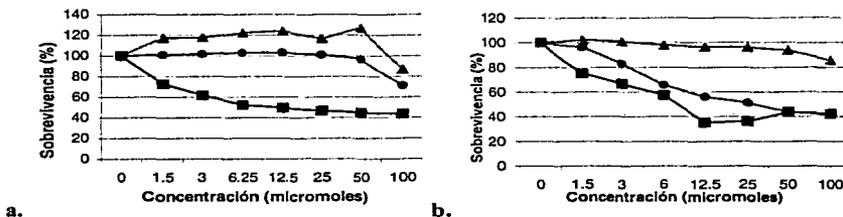


Fig. 15 _ Curvas de citotoxicidad a fármacos en presencia de Cs-A. La sobrevivencia de VP-1 en función de la concentración de Etoposido (a) y Doxorubicina (b). En cada cuadro aparecen las siguientes células: I-51 (■), VP-1 + fármaco (▲), VP-1 + fármaco + 5 μM de Cs-A (●).

Estos resultados confirmaron la suposición de que la DXR es expulsada a través de gp-P y señalan además a este mecanismo como el más importante en la expulsión de ese fármaco. No obstante, en el caso de VP-16, el efecto no fue tan grande, por lo que se pudo descartar hasta cierto punto como principal mecanismo de resistencia a etopósido por parte de las células VP-1. El hecho de haber encontrado en VP-1 más de un mecanismo contribuyendo a la resistencia a fármacos, no es algo que contradiga a la literatura, y por el contrario es poco frecuente encontrar un único de mecanismo de resistencia en células tumorales (62, 67, 68).

En resumen, los resultados muestran que la línea celular VP-1 presenta varias alteraciones en la secuencia génica del gen de top-2 α , las cuales se remiten al extremo COOH, aunque también parecen abarcar la última parte del dominio de corte-unión. La línea parental parece presentar *per se* alteraciones parecidas. Para el producto, ambas líneas expresan una proteína de 170 kDa, localizado predominantemente en el núcleo nuclear. Sin embargo, se desconoce si uno de los alelos transcribe para una proteína de menor tamaño que no tiene el epítipo reconocido por el anticuerpo. De manera interesante, se encontró una disminución en la actividad nuclear de top-2 α en las células VP-1, misma que corrobora los datos del análisis del transcrito y que puede explicar mejor la resistencia a VP-16.

Por último al estudiar otros mecanismos de resistencia múltiple, se encontró actividad de gp-P en la expulsión de DXR, abriendo la posibilidad de que otros fármacos puedan ser expulsados por esta vía.

A pesar de que no se obtuvo con precisión un mapa para la localización de las alteraciones del gen de top-2 α , que permita predecir la resistencia observada a etopósido, todas las evidencias presentadas sugieren que las alteraciones en esta enzima pueden conferir resistencia a fármacos. Además, este trabajo presenta lo que podría ser un buen modelo de estudio para el entendimiento de la biología de la top-2 α , ya que tanto la línea parental como la seleccionada presentan alteraciones muy parecidas, y sin embargo la diferencia en resistencia es muy grande.

CONCLUSIONES

La línea celular VP-1 es notablemente más resistente que la línea parental para tres de los cuatro fármacos utilizados en el estudio. La resistencia a etopósido en la línea celular VP-1 en el presente estudio, no mostró tener una relación concreta con los daños en el transcrito del gen de la top-2 α . Sin embargo la disminución de la actividad de esta enzima en extractos nucleares está probablemente ligada a cambios en la secuencia de nucleótidos, que son diferentes entre la línea parental y la clona resistente, pero tan pequeños que no pudieron ser detectados con las técnicas utilizadas.

La ausencia de otros mecanismos que pudieran estar relacionados con la resistencia a etopósido deja a la top-2 como un mecanismo importante en la adquisición de este fenotipo.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

1. Hesketh R, 1997, The oncogene and tumour suppressor gene. 2° Edition, Academic Press, UK.
2. Perkins AS, Vande Woude GF, 1993, Principles of Molecular Cell Biology of Cancer: Oncogenes. En: Cancer: Principles & Practice of Oncology. 4° Edition, edited by De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, JB Lippincot Co, Philadelphia, 1993
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM, 2001, Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide. 1ª Edición, IARC Cancer Base No. 5, Lyon, IARC Press
4. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA, 1999, Cancer statistics. *Ca-CancerJ Clin* 1999; 49: 8-31
5. Mortalidad, 1996, Subsecretaría de Planeación, Dirección General de Estadística e Informática, Secretaría de Salud
6. Centers for disease control and prevention: Mortality trends for selected smoking-related and breast cancer - United States 1950-1990. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1993, 42 (44): 857, 863 - 866
7. Schottenfeld D, 1996, Epidemiology of Lung cancer. En: *Lung Cancer: Principles and Practice*. Edited by Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT.
8. Feinstein MB, Bach PB, 2000, Epidemiology of Lung Cancer. En: *Lung Cancer: past, present and future*. Ginsberg RJ and Ruckdeschel J, *Chest Surgery Clinics of N. America*, Vol. 10, Num. 4
9. Centers for disease control and prevention: Smoking-attributable mortality and years of potential life lost - United States 1990. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1993, 42 (33): 645 - 648
10. Travis WD, Linder J, Mackay B, 1996, Classification, Histology, Cytology and Electron Microscopy. En: *Lung Cancer: Principles and Practice*. Edited by Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT.

11. Lazo JS, Larner JM, 1994, Individual Antineoplastic Drugs. En: Human Pharmacology: Molecular to clinical. Edited by Broody TM, y cols., Mosby Year Book Inc.
12. Bonomi P, Non-Small Cell Lung Cancer Chemotherapy. En: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, 1996, Lung Cancer: Principles and Practice, Chapter 55, Lippincot-Raven, USA
13. Crop MJ, 1993, P-glycoprotein structure and evolutionary homologies. En: Multiple Drug Resistance in Cancer, edited by M Clynes, Capitulo 1, Kluwer Academic Publishers
14. Lizano Soberón M, Barrera Rodríguez R, 1993, Resistencia múltiple a drogas: un problema en la quimioterapia de cáncer. Rev Invest Clin, 45: 481-492
15. Juliano LR, Ling V, 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta, 455:152-162
16. Nittis JL, 1998, Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. Biochim Biophys Acta, 1400: 63-81
17. Wang JC, 1987, Recent studies of DNA topoisomerases. Biochim Biophys Acta, 909: 1-9
18. Pommier Y y cols, 1998, Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. Biochim Biophys Acta, 1400: 83-106
19. Hanai R, Caron PR, Wang JC, 1996, Human TOP3: A single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 3653-3657
20. Shu-Wing Ng, Liu Y, Hasselblatt KT, Mok SC, Berkowitz RS, 1999, A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. Nucleic Acids Res, 27; 4: 993-1000
21. Hotoda N, Hanai R, 2000, Characterization of Recombinant Human DNA Topoisomerase III- α Activity Expressed in Yeast. J Biochem 127: 1109-1113.
22. Berger JM, 1998, Type II DNA topoisomerases. Curr Opin Struc Biol 8: 26-32
23. Berger JM, Gambilin SJ, Harrison SC, Wang JC, 1996, Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. Nature 379; 18: 225-232
24. Stasiak A, 2000, Feeling the pulse of a topoisomerase. Current Biology, 10; 14: R526 – R528

25. Lang AJ, Mirsky SEL, Cummings HJ, Yu Q, Gwrlach JH, Cole SPC, 1998, Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gen*, 221: 255-266
26. Austin CA, Marsh KL, 1998, Eukaryotic DNA topoisomerase II- β . *BioEssays*, 20: 215-226
27. Burden DA, Osheroff N, 1998, Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1400: 139-154
28. Bjergbaek L, Kingma P, Nielsen IS, Wang Y, Westergaard O, Osheroff N, Andersen AH, 2000, Communication between the ATPase and Cleavage/Religation Domains of Human Topoisomerase II α . *J Biol Chem*, 275; 17: 13041-13048
29. Mirsky SEL, Gerlach JH, Cumming HJ, Zirngibl R, Greer PA, Cole SPC, 1997, Bipartite Nuclear Localization Signals in the C Terminus of Human Topoisomerase II- α . *Exp Cell Res*, 237: 452-455
30. Mirsky SEL, Gerlach JH, Cole SPC, 1999, Sequence Determinants of Nuclear Localization in the α and β isoforms of Human Topoisomerase II. *Exp Cell Res*, 251: 329-339
31. Escargueil AE, Plisov SY, Filhol O, Cochet C, Larsen AK, 2000, Mitotic Phosphorylation of DNA Topoisomerase II α by Protein Kinase CK2 creates the MPM-2 Phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem*, 275; 44: 34710 - 34718
32. Wang JC, 1996, DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 65: 635-692
33. Mo YY, Beck WT, 1999, Association of Human DNA Topoisomerase II- α with Mitotic Chromosomes in Mammalian Cells is Independent of its Catalytic Activity. *Experimental Cell Research*, 252: 50-62
34. Valkov NI, Gump JL, Engel R, Sullivan DM, 2000, Cell density-dependent VP-16 sensitivity of leukaemic cells is accompanied by the translocation of topoisomerase II- α from the nucleus to the cytoplasm. *Br J Haematol*, 108: 331-345
35. Barthelmes HU, Gue P, Feineis S, Straub T, Boege F, 2000, Active DNA topoisomerase II- α is a component of the Salt-stable Centrosome Core. *J Biol Chem*, 275; 49: 38823 - 38830
36. Kaufmann SH, 1998, Cell death induced by topoisomerase targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta*, 1400: 139-154

37. Hande KR, 1998, Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta*, 1400: 173-184
38. Campain JA, Gottesman MM, Pastan I, 1994, A novel mutant topoisomerase II α present in VP-16-resistant human melanoma cell lines has a deletion of alanine 429. *Biochemistry*, 33: 11327-11332
39. Bugg BY, Danks MK, Beck WT, Suttle DP, 1991, Expression of a mutant DNA topoisomerase II in CCRF-CEM human leukemia cells selected for resistance to teniposide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7654-7658
40. Lee MS, Wang JC, Beran M, 1992, Two independent amsacrine-resistant human myeloid leukemia cell lines share an identical point mutation in the 170 kDa form of the human topoisomerase II. *J Mol Biol*, 223: 837-843
41. Kubo A, Yoshikawa A, Hirashima T, Masuda N, Takada M, Takahara J, Fukuoka M, Nakagawa K, 1996, Point mutations of the topoisomerase II alpha gene in patients with small cell lung cancer treated with etoposide. *Cancer Res*, 56: 1232-1236
42. Hinds M, Deisseroth K, Mayers J, Altschuler E, Jansen R, Ledley FD, Zwelling LA, 1991, Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from human leukemia cell line containing an amsacrine-resistant form of topoisomerase II. *Cancer Res*, 51: 4729-44731.
43. Patel S, Fisher LM, 1993, Novel selection and genetic characterization of an etoposide-resistant human leukaemic CCRF-CEM cell line. *Br J Cancer*, 67: 456-463
44. Danks MK, Warmouth MR, Friche E, Granzen B, Bugg BY, Harker WG, Zwelling LA, Futsher BW, Suttle DP, Beck WT, 1993, Single-strand conformational polymorphism analysis of the Mr 170,000 isozyme of DNA topoisomerase II in human tumor cells. *Cancer Res*, 53: 1373-1379
45. Kohno K, Danks MK, Matsuda T, Nitiss JL, Kuwano M, Beck WT, 1995, A novel mutation of DNA topoisomerase II α gene in an etoposide-resistant human cancer cell line. *Cell Pharmacol*, 2: 87-90
46. Matsumoto Y, Takano H, Fojo T, 1997, Cellular adaptation to drug exposure: evolution of the drug-resistant phenotype. *Cancer Res*, 57: 5086-5092.

47. Mirski SEL, Cole SPC, 1995, Cytoplasmatic localization of a mutant M(r) 160,000 topoisomerase II alpha is associated with the loss of putative bipartite nuclear localization signals in a drug resistant human lung cancer cell line. *Cancer Res*, 55: 2129-2134
48. Harker WG, Slade DL, Parr RL, Holguin MH, 1995, Selective use of an alternative stop codon and polyadenylation signal within intron sequences leads to a truncated topoisomerase II α messenger RNA and protein in human HL-60 leukemia cells selected for resistance to mitoxantrone. *Cancer Res*, 55: 4962-4971
49. Yu Q, Mirsky SE, Sparks KE, Cole SP, 1997, Two COOH-terminal truncated cytoplasmic forms of topoisomerase II alpha in a VP-16 selected lung cancer cell line result from partial gene deletion and alternative splicing. *Biochemistry*, 36: 5868-5877
50. Wessell I, Jensen PB, Falck J, Mirski SE, Cole SP, Sehested M, 1997, Loss of amino acid ₁₄₉₀-Lys-Ser-Lys-₁₄₉₂ in the COOH-terminal region of topoisomerase II α in human small cell lung cancer cells selected for resistance to etoposide results in an extranuclear enzyme localization. *Cancer Res*, 57: 4451-4454
51. Vassetzky YS, Alghisi GC, Gasser SM, 1995, DNA topoisomerase II mutations and resistance to anti-tumor drugs. *BioEssays*, 17, 9: 767-774
52. Turley H, Comley M, Houlbrook S, Nozaki N, Kikuchi A, Hickson ID, Gatter K, Harris AL, 1997, The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer*, 75: 1340-1346
53. Yang X, Li W, Prescott ED, Burden SJ, Wang JC, 2000, DNA Topoisomerase II- β and Neural Development. *Science* 7; 287: 131-134
54. Cole SPC, Deeley RG, 1998, Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *BioEssays* 20: 931-940
55. German U, 1993, Molecular analysis of the multidrug transporter. En: *Multiple Drug Resistance in Cancer*. Edited by M. Clynes, Kluwer Academic Publishers
56. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ, 2000, Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?. *Trends Biochem Sci* 25: 285; 1: 1 - 6
57. Gao M, Yamazaki M, Loe DW, Westlake CJ, Grant CE, Cole SPC, Deeley RG, 1998, Multidrug Resistance Protein. *J Biol Chem*, 23; 17:10733-10740

58. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J, 2000, A family of drug transporters: the Multidrug Resistance-associated Proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92; 16:1295-1302
59. de Jong, S, Zijlstra JG, de Vries EGE, Mulder NH, 1990, Reduced DNA Topoisomerase II activity and drug-induced DNA cleavage activity in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line. *Cancer Res*, 50: 304-309
60. Jensen S, Andersen AH, Kjeldsen E, Biersack H, Olsen EHN, Andersen TB, Westergaard O, Jakobsen BK, 1996, Analysis of Functional Domain Organization in DNA Topoisomerase II from Humans and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 16; 7: 3866 - 3877
61. Mirsky SEL, Evans CD, Almquist KC, Slovak ML, Cole SPC, 1993, Altered Topoisomerase II α in a drug-resistant small cell lung cancer cell line selected in VP-16. *Cancer Res*, 53; 20: 4866 - 4873
62. Matsumoto Y, Kunishio K, Nagao S, 1999, Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide resistant mutants of human glioma cell line. *J Neurooncol*, 45: 37 - 46
63. Bhat UG, Raychaudhuri P, Beck WT, 1999, Functional interaction between human topoisomerase II α and retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7859 - 7864
64. Kwon Y, Sic Shin B, Kwon Chung I, 2000, The p53 Tumor suppressor stimulates the catalytic activity of Human Topoisomerase II α by enhancing the rate of ATP hydrolysis. *J Biol Chem*, 275; 24: 18503 - 18510
65. Cowell IG, Okorokov AL, Cutts SA, Padget K, Bell M, Milner J, Austin CA, 2000, Human Topoisomerase II α and II β interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res*, 255: 86 - 94
66. Ernst AI, Soltermann A, Sigrist JA, Widmer L, Gasser SM, Stahel RA, 2000, Ectopic expression of human topoisomerase II α fragments and etoposide resistance in mammalian cells. *Int J Cancer*, 88 : 99 - 107
67. Brock I, Hipfner DR, Nielsen BS, Jensen PB, Deeley RG, Cole SPC, Shested M, Sequential co-expression of the multidrug resistance genes MRP and *mdr1* and their

products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 55: 459 - 462

68. Matsumoto Y, Takano H, Fojo T, 1996, Acquired resistance to etoposide (VP-16) in a human breast cancer cell line is multifactorial. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res*, 37: A2947