



**Departamento de Radiología
y Medicina Física
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MDR EN UNA
SUBLÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE COLON
HUMANO SELECCIONADA CON COLCHICINA**

Miguel José Ruiz Gómez

Mayo, 1997



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Miguel Jose Ruiz Gomez

 <https://orcid.org/0000-0003-4630-7588>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA

D./Dña: Miguel José Ruiz Gómez, estudiante del Programa de Doctorado Radiología y Oncología de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis titulada "Caracterización del fenotipo MDR en una sublínea celular de adenocarcinoma de colon humano seleccionada con colchicina", presentada para la obtención del título de Doctor/a por la Universidad de Málaga, realizada bajo la tutorización de Manuel Martínez Morillo y dirección de Manuel Martínez Morillo y Antonio Souviron Rodríguez (si tuviera varios directores/as, deberá hacer constar todos los nombres).

Declaro que:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), y sus posteriores modificaciones.

La tesis presentada es fruto de mi trabajo personal. Todas las fuentes han sido citadas correctamente y cualquier uso de herramientas de Inteligencia Artificial (IA) ha sido informado de manera transparente.

DECLARACIÓN SOBRE EL USO DE HERRAMIENTAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL (IA)

Declaro que:

Con la conformidad de mi(s) director(a/es/as), que en la elaboración y redacción de la tesis depositada para solicitar su admisión a trámite he realizado el siguiente uso de herramientas de Inteligencia Artificial (IA):

- No he hecho uso de herramientas de IA para la elaboración y redacción de la tesis doctoral.
- He hecho uso de la/s siguiente/s herramienta/s de IA en los contenidos señalados a continuación, siendo consciente de que ésta puede proporcionar resultados erróneos o sesgados. He comprobado, revisado y editado cuidadosamente el resultado del uso de la IA y soy responsable, en última instancia, del contenido del manuscrito presentado.





| Herramienta | Finalidad | Apartado |
|-------------|-----------|----------|
| | | |
| | | |

DECLARACIÓN SOBRE EL CONTROL ANTIPLAGIO

Declaro que:

- He realizado un control antiplagio sobre el texto completo de mi tesis utilizando la herramienta indicada por la Universidad. He incorporado al DAD el documento generado por dicha herramienta, sin efectuar modificación alguna en el mismo.
- Igualmente asumo, ante la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme el ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a fecha

| FIRMAS | |
|-------------------|----------|
| Doctorando/a: | Tutor/a: |
| Director/a/es/as: | |





UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA
CATEDRA DE RADIOLOGÍA Y
MEDICINA FÍSICA
Prof. M. MARTÍNEZ MORILLO

MANUEL MARTÍNEZ MORILLO, Catedrático de Radiología y Medicina
Física de la Universidad de Málaga:

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta al superior juicio de la Comisión que designe la Universidad de Málaga, D. Miguel José Ruiz Gómez, sobre el tema **CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MDR EN UNA SUBLÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO SELECCIONADA CON COLCHICINA**, realizado bajo mi dirección, presenta los contenidos y el rigor científico suficiente para ser defendido como trabajo de Tesis y optar al grado de Doctor.

Lo que certifico para que surta los efectos oficiales que marca la ley.

En Málaga, a dieciséis de mayo de mil novecientos noventa y siete.

Fdo.: Manuel Martínez Morillo.





UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA,
MEDICINA FÍSICA Y PSIQUIATRÍA

ANTONIO SOUVIRON RODRÍGUEZ, Doctor en Medicina y Cirugía:

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta al superior juicio de la Comisión que designe la Universidad de Málaga, D. Miguel José Ruiz Gómez, sobre el tema **CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MDR EN UNA SUBLÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO SELECCIONADA CON COLCHICINA**, realizado bajo mi dirección, presenta los contenidos y el rigor científico suficiente para ser defendido como trabajo de Tesis y optar al grado de Doctor.

Lo que certifico para que surta los efectos oficiales que marca la ley.

En Málaga, a dieciséis de mayo de mil novecientos noventa y siete.

Fdo.: Antonio Souviron Rodríguez.

A mis padres, Natividad y Miguel
A mi novia y a mi hermano, Pilar y Antonio

A la memoria de mi primo Miguel José

*"Todo credo es falso, todo credo es cierto
Es la verdad un espejo que se ha roto
En mil añicos; pero cada cual se cree
Que poseer un fragmento es poseerlo todo."*

Sir RICHARD BURTON

BECAS

Este trabajo ha llegado a buen término gracias a la Beca de Investigación concedida, por la Asociación Española Contra el Cáncer - Junta Provincial de Málaga, durante los años 1995 y 1996.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas y Entidades que durante estos años me han brindado su generosa colaboración y apoyo:

Al Profesor Dr. Manuel Martínez Morillo, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su Departamento, haber co-dirigido el presente trabajo y por su apoyo y generosidad.

Al Dr. Antonio Souviron Rodríguez, por haberme introducido en el apasionante mundo de la Investigación, haber co-dirigido esta Tesis y por sus sabios consejos.

A D. José Antonio Morales Moreno, compañero investigador y amigo, por tantas y tantas horas compartidas en el laboratorio y por ser ejemplo de voluntad e ilusión en el trabajo.

A D^a Luisa Gil Carmona por su inestimable ayuda como Técnico de Laboratorio y por haber conseguido que la difícil tarea de investigar haya sido cada día más fácil.

Al Profesor Dr. Salvador Perán Mesa, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Málaga, por su generosidad al cedernos la línea celular utilizada.

Al Profesor Dr. José Pedro de la Cruz Cortés y a D. Juan Antonio Pino Blanes, del Departamento de Farmacología, por su generosa ayuda y colaboración en la realización de las medidas de GSH y GST, así como su amabilidad al permitirme hacer uso de sus equipos e instalaciones.

A la Dra. Martina Álvarez Pérez, del Departamento de Anatomía Patológica, por su amabilidad y ayuda al realizar las lecturas de muestras por citometría de flujo.

Al Dr. José Pavía Molina, del Departamento de Farmacología, por su generosidad al permitirme hacer uso de sus equipos de laboratorio.



A D^a Ingrid Valero Rodríguez y D^a Belén Guerrero-Strachan Pastor, del Departamento de Anatomía Patológica, por sus consejos sobre las técnicas de tinción inmunocitoquímica.

A la Asociación Española Contra el Cáncer, Junta Provincial de Málaga; y especialmente a su Presidente D. José Pastor Dobado, por la beca de investigación concedida durante los años 1995 y 1996, gracias a la cual este trabajo se ha podido finalizar.

Al Profesor Dr. Francisco Sendra Portero y al Dr. Rafael Ruiz Cruces, por el tiempo y ayuda que han invertido en la realización de las fotografías, la confianza y ánimo que siempre me han dedicado y sus sabios consejos.

Al Profesor Dr. José Manuel Pastor Vega, por sus consejos en la redacción del tramo final de este trabajo.

A la Dra. Lourdes de la Peña Fernández, por los constantes e incansables ánimos que en todo momento me ha brindado.

Al Dr. Manuel Pérez Martínez, por los años compartidos en el Departamento.

A D^a María Jesús Arévalo, D. Juan Carlos Franco, D^a Dolores Pérez Vicente y D^a Ana Rosa Díaz García, por su ayuda en las gestiones administrativas y por el muy grato período de tiempo que he compartido con ellos en el Departamento.

Al Dr. Francisco Álvarez Rico, por su ayuda con los idiomas y las amenas tertulias científicas compartidas durante los primeros años de trabajo.

Al Dr. Francisco Carrasco Otero, por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del mundo de la investigación.

A D^a Meli Toro Sánchez, D. Eduardo Gutiérrez López y D. Francisco Hidalgo, por los servicios prestados en el desarrollo de este trabajo.

A D^a Ester Ristori Bogajo por su ayuda en la corrección de errores durante la edición de esta Tesis.

A los Laboratorios Lilly, S.A. e Inibsa, S.A., por la colaboración prestada en este estudio.

Especialmente a mis padres, Natividad y Miguel, porque gracias a su esfuerzo y tesón he podido ver concluida mi formación universitaria.

A mi novia y a mi hermano, Pilar y Antonio, por alentarme día a día y ayudarme a superar las dificultades.

A todos los que de una u otra forma se han tomado la molestia de prestarme su apoyo y dedicación.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| I.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1.- CICLO CELULAR Y CRECIMIENTO TUMORAL | 4 |
| I.2.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS | 8 |
| <i>Agentes fase-específicos</i> | <i>8</i> |
| <i>Agentes no fase específicos</i> | <i>9</i> |
| I.2.1.- Toxicidad de la quimioterapia | 11 |
| I.3.- CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS ANTINEOPLÁSICAS | 11 |
| I.3.1.- Antimetabolitos..... | 15 |
| <i>Análogos del ácido fólico</i> | <i>15</i> |
| <i>Análogos de las pirimidinas</i> | <i>15</i> |
| <i>Análogos de las purinas</i> | <i>15</i> |
| I.3.2.- Antibióticos antitumorales..... | 16 |
| <i>Antraciclinas.....</i> | <i>16</i> |
| <i>Bleomicina</i> | <i>16</i> |
| <i>Mitoxantrone</i> | <i>16</i> |
| <i>Actinomicina D (dactinomicina).....</i> | <i>16</i> |
| <i>Mitomicina C.....</i> | <i>16</i> |
| I.3.3.- Agentes alquilantes | 17 |
| I.3.4.- Alcaloides vegetales | 17 |
| <i>Colchicina.....</i> | <i>17</i> |
| <i>Alcaloides de la vinca.....</i> | <i>17</i> |
| <i>Epipodofilotoxinas.....</i> | <i>18</i> |
| I.3.5.- Miscelánea | 18 |
| <i>Hidroxiurea</i> | <i>18</i> |
| <i>L-asparaginasa.....</i> | <i>18</i> |
| <i>Procarbazina</i> | <i>18</i> |
| <i>M-amsa</i> | <i>18</i> |
| I.4.- EL FENOTIPO DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES DROGAS (MDR)..... | 19 |



| | | |
|---------|---|----|
| I.4.1.- | Disminución del acúmulo intracelular de drogas en células MDR..... | 21 |
| I.4.2.- | Resistencia cruzada a las drogas antineoplásicas | 22 |
| I.4.3.- | Sobreexpresión de la glicoproteína-P | 24 |
| I.4.4.- | Reversión de la resistencia a múltiples drogas | 25 |
| | <i>Bloqueadores de canales de calcio</i> | 28 |
| | <i>Ciclosporinas</i> | 30 |
| | <i>Agentes hormonales</i> | 30 |
| | <i>Otros agentes</i> | 31 |
| I.4.5.- | Otros cambios celulares correlacionados con la resistencia a múltiples drogas | 32 |
| I.5.- | GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES DROGAS..... | 35 |
| I.5.1.- | Clonación del gen de la glicoproteína-P y de su ARNm | 35 |
| I.5.2.- | Sobreexpresión del ARNm de la glicoproteína-P y amplificación génica en células MDR..... | 37 |
| I.5.3.- | Organización cromosómica de genes MDR amplificados..... | 39 |
| I.5.4.- | Familia génica de la glicoproteína-P | 40 |
| | <i>El amplicón de la glicoproteína-P</i> | 42 |
| I.5.5.- | Multirresistencia por transfección de ADN..... | 43 |
| I.5.6.- | Expresión del gen MDR1 y su ARNm en tejidos humanos normales y muestras tumorales | 45 |
| | <i>Tejidos humanos normales</i> | 46 |
| | <i>Tumores humanos</i> | 48 |
| I.6.- | ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEÍNA-P | 49 |
| I.6.1.- | Análisis de la secuencia de la glicoproteína-P..... | 50 |
| I.6.2.- | Mutaciones de la glicoproteína-P en la especificidad por el sustrato | 54 |
| I.6.3.- | Homología de la glicoproteína-P con otros sistemas de transporte | 55 |
| I.7.- | MODELO DE FUNCIONAMIENTO DE LA GLICOPROTEÍNA-P | 57 |
| I.7.1.- | Regulación de la glicoproteína-P por la proteína quinasa C | 60 |
| I.8.- | RESISTENCIA MEDIADA POR GLUTATIÓN | 62 |

| | |
|---|----|
| I.9.- RESISTENCIA MEDIADA POR TOPOISOMERASAS | 66 |
| I.9.1.- Regulación de la topoisomerasa II..... | 68 |
| I.9.2.- Topoisomerasa II y resistencia a drogas..... | 69 |
| <i>Mutaciones y topoisomerasas anormales</i> | 69 |
| <i>Metilación</i> | 69 |
| <i>Deprivación de glucosa e hipoxia</i> | 69 |
| <i>Factores citosólicos</i> | 70 |
| <i>Hiperregulación de topoisomerasa I</i> | 70 |
| <i>Topoisomerasa IIβ</i> | 70 |
| I.10.- RESISTENCIA MEDIADA POR REPARACIÓN DEL ADN | 70 |
| I.11.- PLANTEAMIENTOS PARA EL FUTURO | 73 |
| II.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS | 75 |
| III.- MATERIAL Y MÉTODOS | 78 |
| III.1.- LÍNEA CELULAR..... | 79 |
| III.2.- REACTIVOS Y MEDIOS | 79 |
| III.2.1.- Composición del medio de cultivo..... | 79 |
| III.2.2.- Composición de la solución antibiótica-antimicótica PSF | 79 |
| III.2.3.- Composición de la solución salina balanceada de Hank (HBSS) | 80 |
| III.2.4.- Composición del tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS) | 80 |
| III.2.5.- Drogas..... | 83 |
| III.2.6.- Anticuerpos monoclonales | 83 |
| <i>Especificidad</i> | 84 |
| III.3.- APARATAJE DE LABORATORIO..... | 84 |
| III.4.- CONDICIONES DE ESTERILIDAD | 88 |

| | |
|--|-----|
| III.4.1.- Esterilización del material | 88 |
| <i>Material de vidrio</i> | 88 |
| <i>Reactivos y medios</i> | 89 |
| <i>Material plástico</i> | 89 |
| III.5.- EQUIPO INFORMÁTICO | 89 |
| III.5.1.- Hardware | 89 |
| III.5.2.- Software..... | 89 |
| III.6.- CULTIVO CELULAR..... | 90 |
| III.6.1.- Línea celular parental | 90 |
| III.6.2.- Sublínea celular seleccionada con colchicina | 90 |
| III.6.3.- Disgregación celular y subcultivos | 91 |
| <i>Siembras</i> | 91 |
| III.7.- RECUENTO CELULAR | 91 |
| III.7.1.- Porcentaje de células viables | 92 |
| III.7.2.- Número de células/ml..... | 93 |
| III.8.- CRIOPRESERVACIÓN DE MUESTRAS | 94 |
| III.8.1.- Congelación..... | 94 |
| III.8.2.- Descongelación | 94 |
| III.9.- SELECCIÓN CON COLCHICINA DE SUBLÍNEAS CELULARES | 95 |
| III.10.- ENSAYOS CLONOGÉNICOS | 96 |
| III.11.- ENSAYOS DE RESISTENCIA CRUZADA FRENTE A DROGAS ANTITUMORALES | 97 |
| III.11.1.- Efecto del verapamil sobre la reversión de la resistencia a drogas antineoplásicas | 98 |
| III.12.- NIVELES DE GLICOPROTEÍNA-P..... | 98 |
| III.12.1.-Microscopía óptica | 98 |
| III.12.2.-Citometría de flujo..... | 99 |
| <i>Disgregación celular no enzimática</i> | 100 |
| III.13.- CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH) | 101 |

| | |
|---|------------|
| III.14.- ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) | 102 |
| III.15.- ESTADÍSTICA | 102 |
| III.15.1.-Normalidad de los datos | 102 |
| III.15.2.- Test t-Student..... | 103 |
| III.15.3.-Análisis de la Varianza de I vía (ANOVA-I)..... | 103 |
| IV.- RESULTADOS | 105 |
| IV.1.- SELECCIÓN CON COLCHICINA DE SUBLÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO | 106 |
| IV.2.- RESISTENCIA A COLCHICINA DE LA SUBLÍNEA CELULAR SELECCIONADA | 109 |
| IV.3.- RESISTENCIA CRUZADA CON OTRAS DROGAS ANTINEOPLÁSICAS | 113 |
| IV.3.1.- Dosis inhibitoria 50 % (ID ₅₀) | 113 |
| IV.3.2.- Resistencia relativa..... | 115 |
| IV.4.- EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P..... | 115 |
| IV.4.1.- Microscopía óptica | 116 |
| IV.4.2.- Citometría de flujo..... | 118 |
| <i>Contenido en glicoproteína-P de la sublínea celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH})</i> | <i>118</i> |
| <i>Contenido en glicoproteína-P durante el proceso de selección</i> | <i>121</i> |
| IV.5.- EFECTO DEL VERAPAMIL SOBRE LA REVERSIÓN DE RESISTENCIA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS | 125 |
| IV.5.1.- Curvas dosis-respuesta | 125 |
| IV.5.2.- Dosis inhibitoria 50 % (ID ₅₀) | 131 |
| IV.5.3.- Tasa de sensibilización relativa..... | 133 |
| IV.5.4.- Incremento de dosis de verapamil..... | 135 |
| IV.6.- CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH) | 139 |
| IV.7.- ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) | 140 |



| | |
|--|-----|
| V.- DISCUSIÓN | 142 |
| V.1.- SELECCIÓN CON COLCHICINA DE SUBLÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO..... | 143 |
| V.2.- RESISTENCIA A COLCHICINA DE LA SUBLÍNEA CELULAR SELECCIONADA..... | 145 |
| V.3.- RESISTENCIA CRUZADA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS..... | 147 |
| V.4.- EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P..... | 151 |
| V.5.- EFECTO DEL VERAPAMIL SOBRE LA REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS..... | 155 |
| V.6.- CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH) Y ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)..... | 162 |
| VI.- CONCLUSIONES | 163 |
| VII.- BIBLIOGRAFÍA | 166 |

ÍNDICE DE FIGURAS

I.- INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| Fig. I.1.- Fases del ciclo celular | 6 |
| Fig. I.2.- Crecimiento tumoral y fracaso de la quimioterapia | 7 |
| Fig. I.3.- Mecanismos de acción de los agentes antineoplásicos | 10 |
| Fig. I.4.- Estructura química de la colchicina..... | 13 |
| Fig. I.5.- Estructura química de la vinblastina..... | 13 |
| Fig. I.6.- Estructura química de la vincristina | 14 |
| Fig. I.7.- Estructura química de la mitomicina C | 14 |
| Fig. I.8.- Estructura química del verapamil | 30 |
| Fig. I.9.- Estructura tridimensional de la glicoproteína-P | 53 |
| Fig. I.10.- Modelo de funcionamiento de la resistencia mediada por glicoproteína-P | 59 |
| Fig. I.11.- Modelo de regulación de la actividad de la glicoproteína-P por la proteína quinasa C | 61 |
| Fig. I.12.- Ruta metabólica del glutatión..... | 63 |

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| Fig. III.1.- Incubador de CO ₂ , marca Selecta..... | 85 |
| Fig. III.2.- Cabina de flujo laminar vertical, marca TC-72 Gelaire-Flow laboratories | 86 |
| Fig. III.3.- Vistas parciales del laboratorio de cultivos celulares | 87 |
| Fig. III.4.- Representación de una cámara de Neubauer o Hemocitómetro | 93 |
| Fig. III.5.- Protocolo de selección de la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 96 |

IV.- RESULTADOS

| | |
|---|-----|
| Fig. IV.1.- Curvas dosis-respuesta frente a colchicina, de los cuatro clones de adenocarcinoma de colon humano aislados (HCA-1,...,-4/1 ^{CCH}) | 107 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Fig. IV.2.- Microscopía óptica de contraste de fases de ambas poblaciones celulares..... | 108 |
| Fig. IV.3.- Curvas dosis-respuesta frente a colchicina de las líneas celulares HCA y HCA-2/1 ^{CCH} | 110 |
| Fig. IV.4.- Resultado de un ensayo clonogénico en monocapa realizado en placas petri..... | 111 |
| Fig. IV.5.- Detalle de colonias, de adenocarcinoma de colon (HCA-2/1 ^{CCH}), crecidas sobre una placa petri..... | 112 |
| Fig. IV.6.- Tinción inmunocitoquímica contra la glicoproteína-P en células HCA-2/1 ^{CCH} cultivadas in vitro..... | 117 |
| Fig. IV.7.- Contenido en glicoproteína-P de la población parental (HCA) y de la subpoblación seleccionada (HCA-2/1 ^{CCH})..... | 120 |
| Fig. IV.8.- Evolución del contenido en glicoproteína-P a lo largo del proceso de selección | 122 |
| Fig. IV.9.- Histogramas del contenido en glicoproteína-P durante el proceso de selección | 124 |
| Fig. IV.10.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a colchicina en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 127 |
| Fig. IV.11.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a vinblastina en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 128 |
| Fig. IV.12.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a vincristina en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 129 |
| Fig. IV.13.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a mitomicina C en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 130 |
| Fig. IV.14.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia..... | 134 |
| Fig. IV.15.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a colchicina en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 136 |
| Fig. IV.16.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a vinblastina en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 137 |
| Fig. IV.17.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a vincristina en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 138 |
| Fig. IV.18.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a mitomicina C en la sublínea celular HCA-2/1 ^{CCH} | 139 |
| Fig. IV.19.- Evolución de la actividad glutatión S-transferasa y de la concentración de glutatión total, durante el proceso de selección | 141 |

ÍNDICE DE TABLAS

I.- INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| Tabla I.1.- Clasificación de los agentes quimioterapéuticos según su relación con el ciclo celular..... | 8 |
| Tabla I.2.- Clasificación de los agentes antineoplásicos | 12 |
| Tabla I.3.- Mecanismos de resistencia a la quimioterapia..... | 20 |
| Tabla I.4.- Drogas quimioterapéuticas asociadas con el fenotipo MDR..... | 23 |
| Tabla I.5.- Moduladores o revertidores del fenotipo MDR..... | 27 |
| Tabla I.6.- Cambios bioquímicos en líneas celulares MDR..... | 33 |
| Tabla I.7.- Familia génica de la glicoproteína-P..... | 41 |
| Tabla I.8.- Grado de expresión del gen MDR1 en tejidos normales | 47 |
| Tabla I.9.- Proteínas homólogas u análogas a la glicoproteína-P..... | 55 |

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|---|-----|
| Tabla III.1.- Composición química del medio de cultivo RPMI-1640..... | 81 |
| Tabla III.2.- Composición química de la solución PSF (100 X) | 82 |
| Tabla III.3.- Composición química de la solución salina balanceada de Hank (HBSS)..... | 82 |
| Tabla III.4.- Composición química del tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS)..... | 82 |
| Tabla III.5.- Ejemplo de tabla obtenida para el Análisis de la Varianza (ANOVA-I)..... | 104 |

IV.- RESULTADOS

| | |
|---|-----|
| Tabla IV.1.- Resistencia cruzada y resistencia relativa de ambas poblaciones celulares | 114 |
| Tabla IV.2.- Contenido en glicoproteína-P de ambas líneas celulares | 121 |
| Tabla IV.3.- Intervalos significativos de reversión de resistencia | 131 |
| Tabla IV.4.- Efecto del verapamil sobre la dosis ID ₅₀ y la reversión de resistencia a drogas en la sublínea celular seleccionada | 132 |
| Tabla IV.5.- Contenido en glutatión y actividad glutatión S-transferasa de ambas líneas celulares | 141 |

I.- INTRODUCCIÓN

La resistencia oncológica a drogas citotóxicas se considera una de las mayores causas de fallo clínico (*Beck y Qian, 1992*) de la quimioterapia (*Perez et al., 1993; Harris y Hochhauser, 1992*). Casi el 50 % de los pacientes con cáncer tienen tumores que son resistentes a la quimioterapia. Los tumores desarrollan o adquieren resistencia durante el curso del tratamiento a pesar de presentar respuesta inicial al mismo (*Kirschner et al., 1992*). Se estima que la resistencia a drogas contribuye a más del 90 % de las muertes por cáncer (*Young, 1990; Lum et al., 1993*). Se han obtenido tumores resistentes a drogas por selección *in vitro* de líneas celulares capaces de crecer en concentraciones crecientes de varios agentes citotóxicos (*Slovak et al., 1991; Juranka et al., 1989*). La caracterización de modelos tumorales seleccionados para resistencia a colchicina, vincristina, vinblastina, taxol, actinomicina D, daunorubicina y adriamicina han revelado fenotipo de resistencia a múltiples drogas, en la cual la resistencia al agente de selección está acompañada por resistencia cruzada a drogas citotóxicas de estructura y función no relacionada (*Roninson, 1992; Harris y Hochhauser, 1992; Bradley et al., 1988*). Este fenómeno se denomina resistencia a múltiples drogas (MDR) (*Biedler, 1992*). Existe, por tanto, la posibilidad de que si las células tumorales expresan este fenotipo, puedan desarrollar resistencia aún con una quimioterapia de combinación (*Marie, 1992*). El ADN es el objetivo mayoritario para los agentes antineoplásicos usados en quimioterapia. Pero, para alcanzar el ADN las drogas deben atravesar las barreras defensivas de la membrana celular y el citoplasma (*Masters, 1990*). El más importante avance ha sido el descubrimiento de la expresión de una glicoproteína de la membrana plasmática, de alto peso molecular, denominada glicoproteína-P (Gp-P) o P-170, la cual está íntimamente relacionada con la resistencia a múltiples drogas en estos modelos. Esta proteína actúa como una bomba de membrana que activamente exporta drogas al exterior celular (*Biedler, 1992*). Una vez que la droga ha alcanzado el citoplasma, se expone a diferentes mecanismos de detoxificación. Algunos de ellos siempre están presentes en el citoplasma, mientras que otros son inducidos por la presencia de la droga. Incluso cuando la droga ha alcanzado su último objetivo y ha provocado daño en el ADN, algunas células son resistentes a causa de la gran capacidad de reparación de ese daño (*Masters, 1990*).

Aunque estudios de otros modelos han revelado mecanismos de resistencia que no involucran la sobreexpresión de la Gp-P, tales como alteración de la actividad topoisomerasa de ADN, glutatión S-transferasa (GST); también se han encontrado niveles elevados de enzimas metabolizadoras de radicales libres tales como superóxido dismutasa y catalasa, asociadas a la resistencia a drogas (*Masters, 1990*). La Gp-P asociada a multirresistencia es

corrientemente el mejor aspecto farmacológico, bioquímico y genético caracterizado (Bradley *et al.*, 1988). Se han encontrado niveles relativamente elevados en muestras diversas de biopsias de una gran variedad de tipos tumorales (Slovak *et al.*, 1991). Las células tumorales son más eficientes que las normales en cambiar su respuesta a la quimioterapia y convertirse en resistentes. Así mismo, las células cancerígenas son más mutagénicas que las normales y sus poblaciones más heterogéneas (Masters, 1990). La caracterización del fenotipo de resistencia a múltiples drogas (MDR) en sistemas experimentales tendrá una gran importancia en el abordamiento del problema clínico que representa la respuesta tumoral a la quimioterapia (Sugawara *et al.*, 1989).

Desde la aparición de los primeros citostáticos, la resistencia celular a los mismos ha sido una limitación para el éxito de los tratamientos. Los progresos de la biología molecular permiten ahora un mejor conocimiento de los fenómenos de resistencia, lo que permitirá un nuevo abordamiento terapéutico en el tratamiento del cáncer (Pastan y Gottessman, 1992).

El adenocarcinoma colorectal es uno de los tumores más frecuentes. Aunque su apariencia histopatológica es bastante uniforme, el pronóstico de pacientes en el mismo estadio puede variar sustancialmente a causa de las características biológicas específicas de cada tumor. Por tanto, los parámetros que nos permitan predecir el curso de la enfermedad pueden ayudarnos a encontrar estrategias terapéuticas adecuadas (Mayer *et al.*, 1993).

Actualmente, sólo el desarrollo de nuevas drogas y el uso de terapia de combinación produce las mejores respuestas al tratamiento. Un incremento en la intensidad del tratamiento, dando mayores dosis en períodos de tiempo más cortos, parece ser una forma de prevenir el desarrollo de resistencia a drogas (Sevin *et al.*, 1993).

I.1.- CICLO CELULAR Y CRECIMIENTO TUMORAL.

Cuando se diagnostica un tumor, éste ya ha alcanzado más de 10^9 células, aunque sólo una proporción de ellas está en división. Inicialmente el tumor crece exponencialmente ya que la mayoría de las células están en división y progresivamente a medida que se desarrolla el tumor una gran proporción de ellas entran en fase de inactividad o de reposo. Esto hace que al aumentar el tamaño tumoral, el crecimiento disminuya también de forma exponencial (*González et al., 1992*).

El proceso de proliferación celular atraviesa una serie de fases conocidas como ciclo celular (fig. I.1). Tras la mitosis (fase M), las células permanecen en un período denominado G_1 , en el cual no existe síntesis de ADN pero sí de ARN y proteínas. Al final de G_1 se produce la síntesis de ADN (fase S). En esta fase la célula duplica su contenido en ADN pasando a ser éste tetraploide. Tras la síntesis, la célula entra en la fase G_2 para posteriormente comenzar la mitosis. La duración de las fases S, M y G_2 son constantes en tejidos normales y malignos pero existe una amplia variación en la duración de la fase G_1 . La fase G_1 es generalmente más larga en tumores de crecimiento más lento. La proporción de población celular que permanece proliferativamente activa en el ciclo celular se denomina fracción de crecimiento. La fase G_0 está constituida por las células que han salido fuera del ciclo y por consiguiente no se preparan para la síntesis de ADN (*Rankin y Kaye, 1990*).

La quimioterapia antineoplásica consiste en el tratamiento de enfermedades neoplásicas mediante sustancias químicas, con intención curativa o paliativa. Se basa en la interferencia de dichas sustancias en los mecanismos fisiológicos que intervienen principalmente en la división celular. Es por tanto en tumores con mayor fracción de crecimiento y por consiguiente mayor porcentaje de células en fase de síntesis de ADN en los que se obtienen mejores resultados. (*González et al., 1992*).

Los fármacos antineoplásicos destruyen las células cancerosas según una cinética de primer orden, es decir, una determinada dosis de un fármaco destruirá un porcentaje constante de células, sea cual sea el número total de las mismas. Tras un tratamiento inicial citorreductor, con el cual se intentaría la reducción, como mínimo, de tres logaritmos del número de células tumorales, se entraría en una fase invisible de la enfermedad o enfermedad

mínima residual. Si el tratamiento no se continuara, se produciría un nuevo crecimiento hasta la fase visible de la enfermedad, por lo que el tratamiento postremisión es esencial para la eliminación total de las células tumorales (fig. I.2) (*Skipper et al., 1964*).

Todas las células de un tumor descienden de una única célula progenitora. No obstante, dentro de un mismo tumor, existe una heterogeneidad dentro de las células neoplásicas que se manifiesta como variaciones en la histopatología, la citogenética, la expresión de antígenos de superficie, la fracción de crecimiento, y lo que es más importante, en la sensibilidad a los fármacos citotóxicos. El factor responsable más importante en la heterogeneidad de la población tumoral es la aparición de mutaciones espontáneas. Estas se producen durante la mitosis, por lo que en los tumores de rápido crecimiento, la probabilidad de encontrar células resistentes a la quimioterapia será mucho mayor (*González et al., 1992; Goldie y Coldman, 1983*).

El efecto de la quimioterapia sobre un tumor está influenciado por algunas características de su patrón de crecimiento (*Rankin y Kaye, 1990*):

- La respuesta a la quimioterapia es proporcional al número de células en fase de síntesis de ADN.
- Mientras más corto es el tiempo de duplicación en el tratamiento mejor es la respuesta a la quimioterapia ya que mayor número de células estarán sintetizando ADN.
- A medida que el tumor crece la enfermedad resulta menos fácil de curar.
- A medida que el tumor se reduce con el tratamiento, la tasa de crecimiento aumenta, debido a la curva estándar de crecimiento

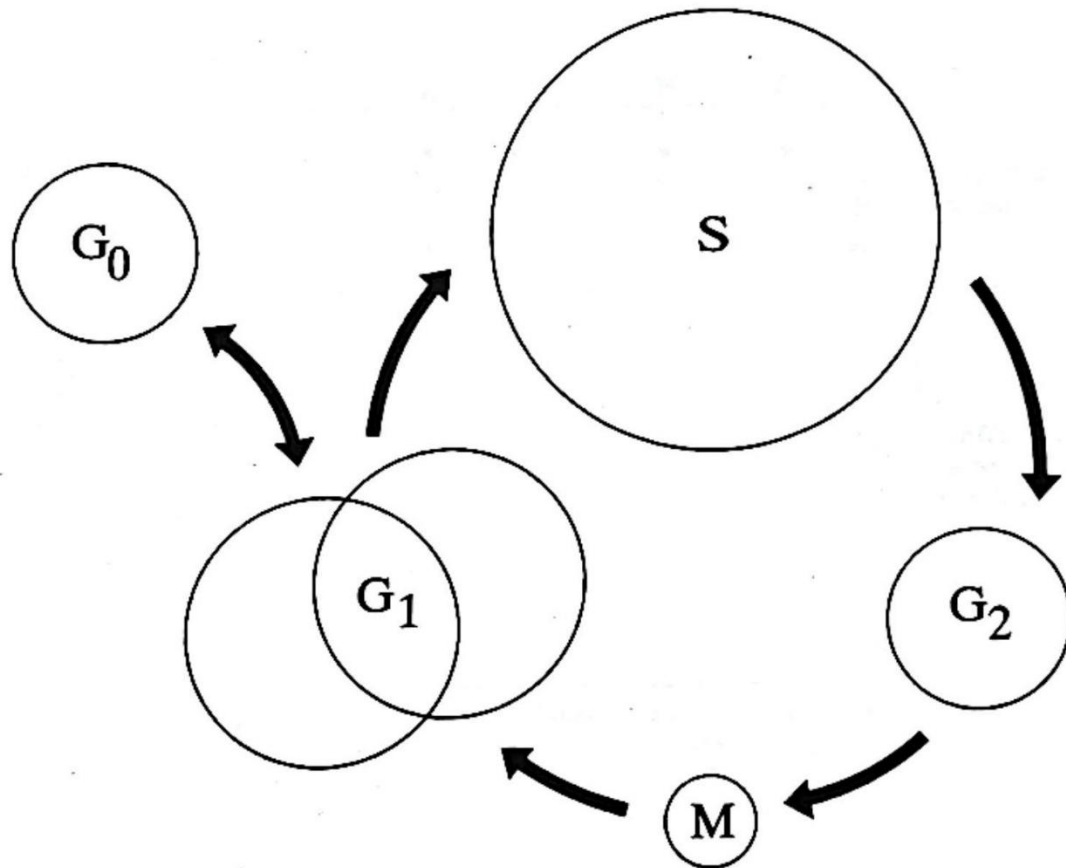


Figura I.1.- Fases del ciclo celular.

Las células tras haberse dividido entran en la fase G₁ donde se produce la síntesis de ARN y proteínas o por el contrario salen del ciclo y permanece en la fase G₀. Al finalizar la fase G₁ comienza la síntesis de ADN (fase S), donde las células pasan a ser tetraploides. Una vez terminada la síntesis, las células pasan por la fase G₂, tras la cual entran en mitosis. El tamaño de los círculos hace alusión a la duración de cada fase.

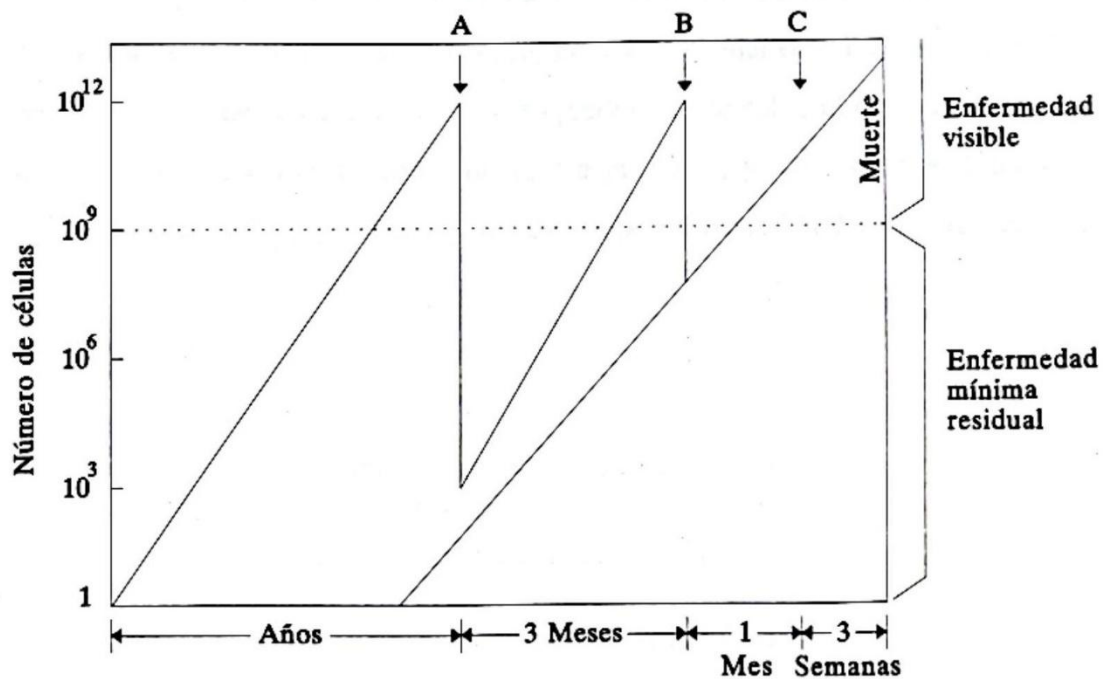


Figura I.2.- Crecimiento tumoral y fracaso de la quimioterapia.

El primer ciclo de quimioterapia (A) parece tener éxito ya que reduce el tumor hasta un tamaño indetectable al matar la mayoría de las células sensibles a la droga. Sin embargo, no tiene éxito sobre las poblaciones mutantes resistentes que crecen de forma exponencial. La detección de recurrencia hace que se aplique una 2ª tanda de quimioterapia (B). Se reduce nuevamente la población sensible, pero no tiene ningún efecto sobre la fracción de células resistentes. Una tercera tanda de quimioterapia (C) ya no produce efecto alguno, y el crecimiento del tumor lleva a la muerte del paciente (González *et al.*, 1992).

I.2.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS.

Los agentes quimioterápicos actúan interfiriendo en los procesos fisiológicos de la proliferación celular. Sus principales objetivos son la síntesis de nucleótidos, de ADN, ARN y proteínas; inhibiendo las enzimas involucradas en estas rutas metabólicas. Sin embargo, otros agentes interfieren con los mecanismos de reparación del ADN, provocan roturas en la cadena o simplemente impiden el ensamblaje de los microtúbulos; provocando, en todo caso, la muerte celular (fig. I.3). Estos agentes se pueden agrupar de acuerdo con su efecto predominante sobre el ciclo celular. Así, se distinguen los fase específicos y no fase específicos; y éstos últimos a su vez se subdividen en ciclo específicos y no cicloespecíficos (tabla I.1) (*González et al., 1992*).

Tabla I.1.- Clasificación de los agentes quimioterapéuticos según su relación con el ciclo celular.

| AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS | |
|----------------------------|--|
| Fase específicos | No fase específicos |
| | <i>Ciclo específicos</i> <i>No ciclo específicos</i> |

Agentes fase-específicos.

Sóloamente son eficaces sobre las células que se encuentran en una determinada fase del ciclo celular. El aumento de dosis no se correlaciona con un incremento en la destrucción celular. Si el agente quimioterápico se expone durante un período de tiempo, más células tumorales podrán entrar en la fase del ciclo celular en la que el agente es activo, y por tanto podrá aumentar la destrucción celular. Ej.: L-asparaginasa (fase G₁), antimetabolitos (fase S) y los alcaloides de la vinca (fase M).

Agentes no fase específicos.

Son activos en cualquier fase del ciclo celular, y por tanto, suelen poseer una curva dosis-respuesta lineal; es decir, a mayor dosis administrada mayor fracción de células destruidas. Se distinguen a su vez dos tipos:

- **Agentes ciclo específicos:** Actúan sobre las células con capacidad de división; es decir sobre células localizadas en cualquier fase del ciclo celular: G₁, G₂, S ó M. Ej.: agentes alquilantes.
- **Agentes no ciclo específicos:** Pueden destruir células sin capacidad de división, o sea, células en fase G₀. Ej.: antibióticos antitumorales.

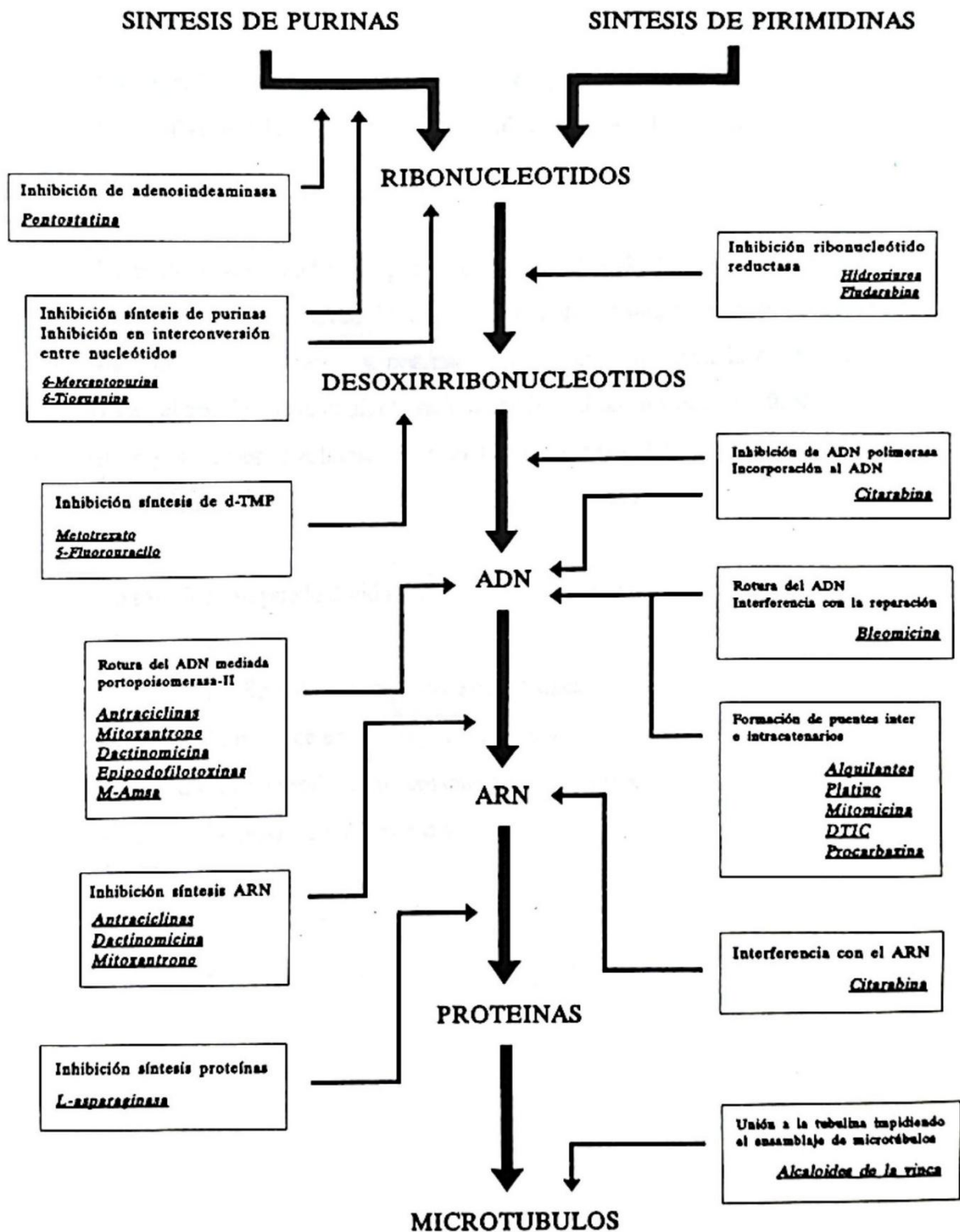


Figura I.3.- Mecanismos de acción de los agentes antineoplásicos.

I.2.1.- Toxicidad de la quimioterapia.

Los agentes quimioterápicos no son completamente específicos y afectan tanto a las células neoplásicas como a las células normales, lo que conlleva un alto grado de toxicidad.

El grado de toxicidad de la quimioterapia depende del fármaco y del paciente. Por parte del fármaco influyen la dosis, la vía de administración y el posible sinergismo con otros fármacos; y por parte del paciente, influyen la reserva de la médula ósea, el estado nutricional, el grado de actividad física y el grado funcional de los órganos y sistemas involucrados en el metabolismo del agente quimioterápico (*González et al., 1992*).

La toxicidad se puede dividir en:

- **Inmediata:** Se produce en horas o pocos días.
- **Precoz:** Se produce en días o pocas semanas.
- **Retardada:** Se produce en semanas o pocos meses.
- **Tardía:** Se produce en meses o años.

I.3.- CLASIFICACIÓN DE LAS DROGAS ANTINEOPLÁSICAS.

Las drogas antitumorales se clasifican en antimetabolitos, antibióticos antitumorales, agentes alquilantes, alcaloides vegetales y miscelánea (tabla I.2) (*González et al., 1992*).

En las figuras I.4, I.5, I.6 y I.7, se exponen las estructuras químicas de las drogas colchicina, vinblastina, vincristina y mitomicina C; que fueron las que se utilizaron en los ensayos de este trabajo.

Tabla I.2.- Clasificación de los agentes antineoplásicos.

| | |
|--|---|
| <p>ANTIMETABOLITOS</p> | <p>Análogos del ácido fólico Metotrexato Análogos de la pirimidina Arabinósido de citosina, 5-fluorouracilo Análogos de las purinas 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, Deoxicoformicina, 2-clorodeoxiadenosina, Fludarabina</p> |
| <p>ANTIBIÓTICOS ANTITUMORALES</p> | <p>Mitoxantrone, Bleomicina, Actinomicina D, Mitomicina C, Gramicidina D, Puromicina Antraciclinas Daunorrubicina, Adriamicina, Idarrubicina</p> |
| <p>AGENTES ALQUILANTES</p> | <p>Mecloretamina, Ciclofosfamida, Cisplatino, Ifosfamida, Clorambucil, Melfalán, Busulfano, Dacarbazina Nitrosoureas BCNU, CCNU</p> |
| <p>ALCALOIDES VEGETALES</p> | <p>Colchicina Alcaloides de la vinca Vincristina, Vinblastina, Vindesina Epipodofilotoxinas Etopósido/VP-16, Tenopósido/VM-26</p> |
| <p>MISCELÁNEA</p> | <p>L-asparaginasa, Hexametilmelamina, Hidroxiurea, Procarbazina, M-Amsa, Hidrea, Taxol</p> |

Obtenido de González *et al.*, (1992); Ozols, (1992); Mitsuhashi *et al.*, (1992); Mehta *et al.*, (1992); Rankin y Kaye, (1990).

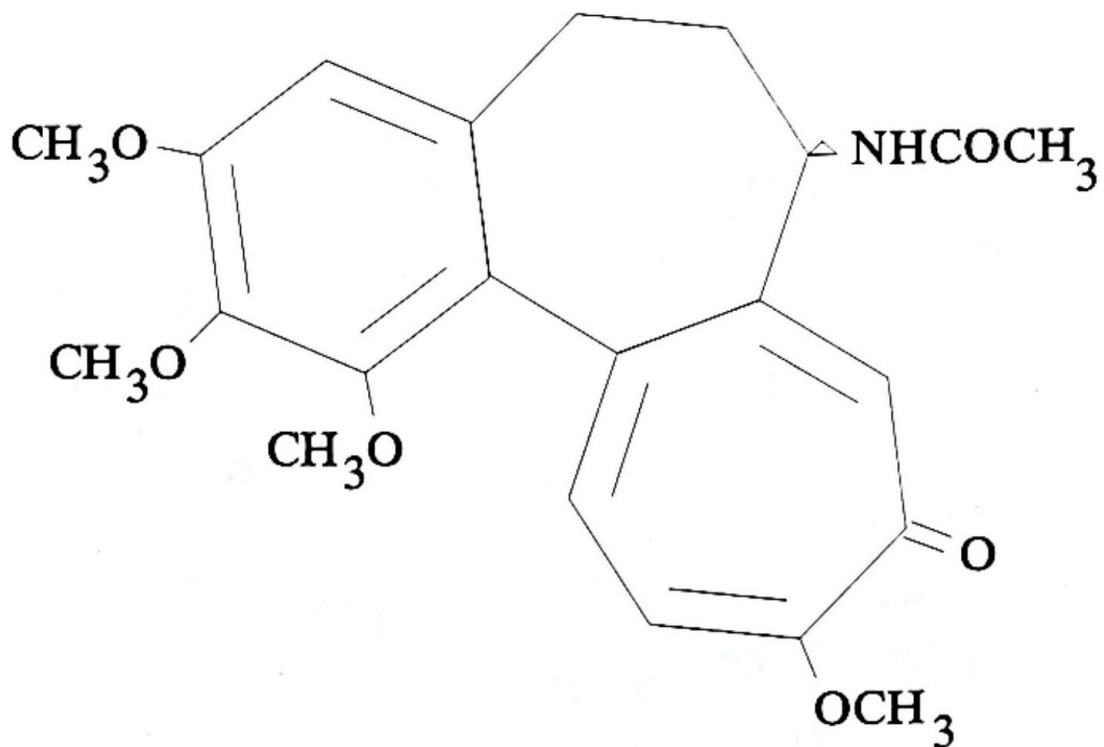


Figura I.4.- Estructura química de la colchicina.

La colchicina es un alcaloide natural y un potente inhibidor de la mitosis celular (*Ford y Hait, 1990*).

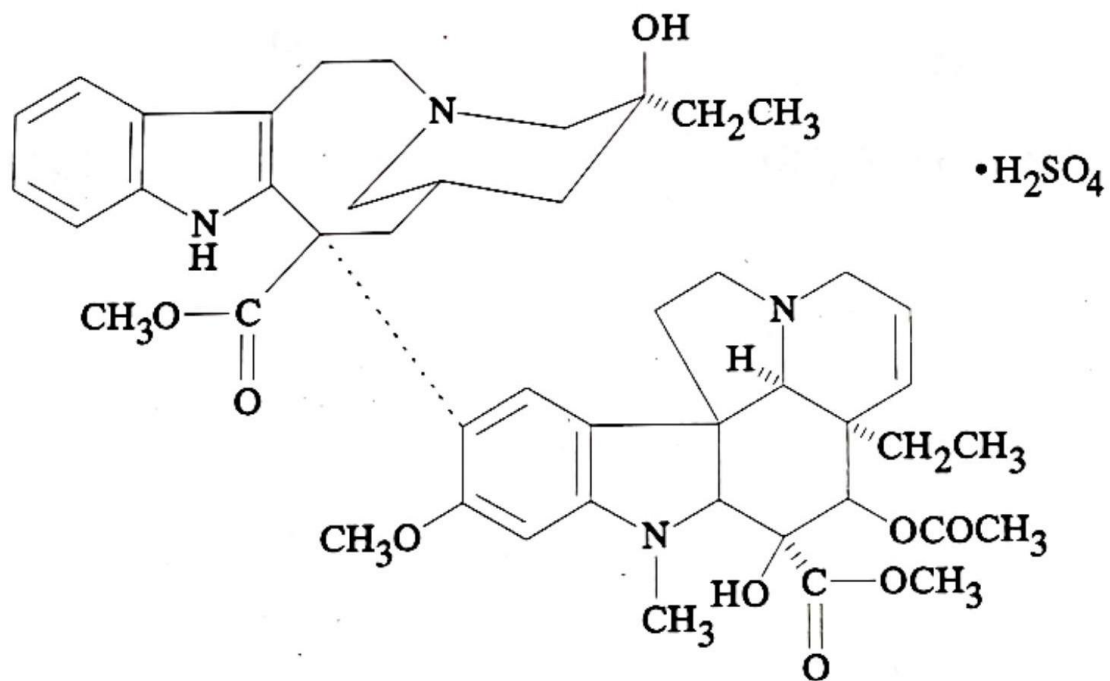


Figura I.5.- Estructura química de la vinblastina.

Es un alcaloide dímérico que contiene radicales indol y dihidroindol.

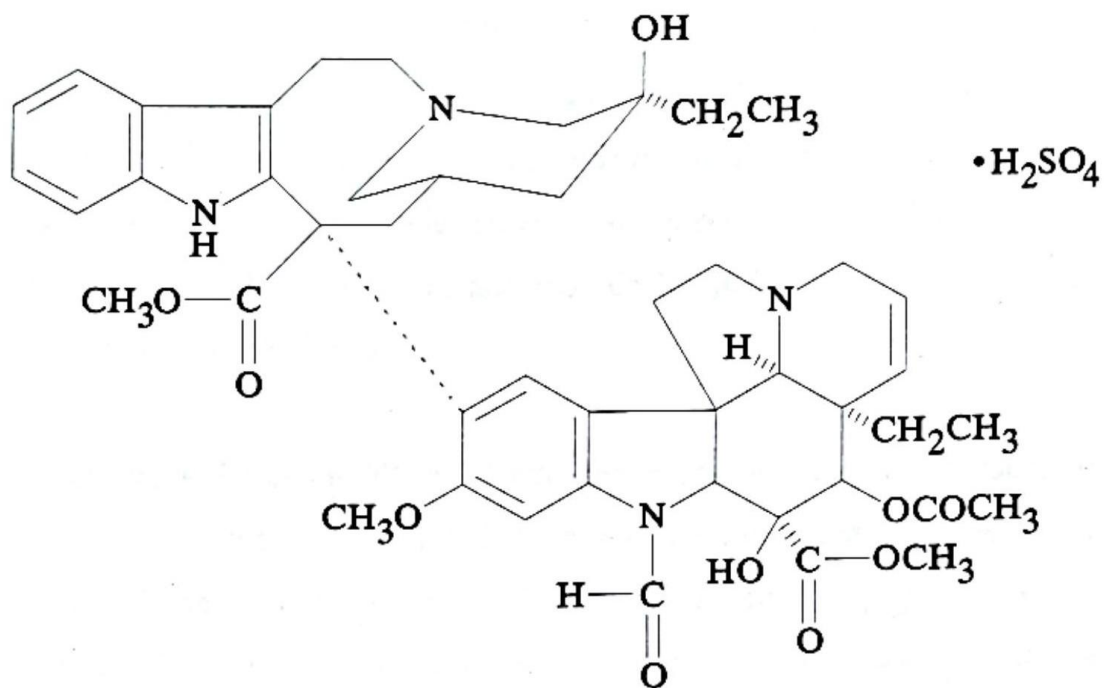


Figura I.6.- Estructura química de la vincristina.

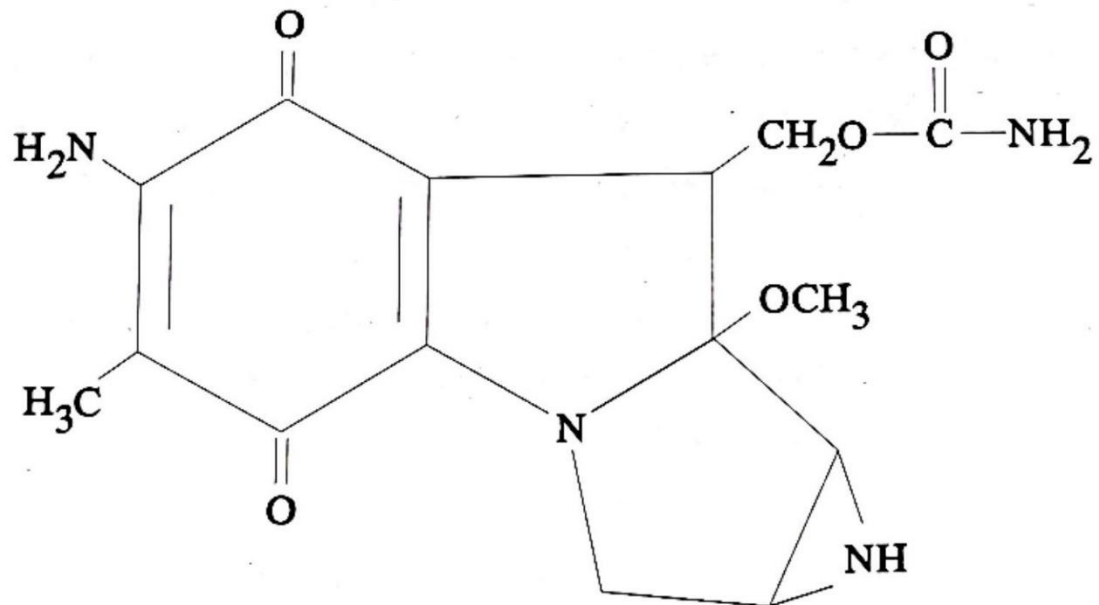


Figura I.7.- Estructura química de la mitomicina C.

I.3.1.- Antimetabolitos.

Son sustancias similares a los metabolitos celulares, pero que difieren en algún grupo funcional de la molécula. Son transportados a través de la membrana celular y metabolizados de la misma forma que los metabolitos normales. Interfieren en la síntesis de los ácidos nucleicos o de sus precursores. Se distinguen varios grupos: análogos del ácido fólico, análogos de las pirimidinas y análogos de las purinas (*González et al., 1992*).

Análogos del ácido fólico. El más representativo es el metotrexato. Actúa inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), produciendo una depleción de coenzimas fólicos necesarios para la biosíntesis de purinas y pirimidinas. Esto ocasiona un bloqueo en la síntesis de ADN y ARN y por tanto se detiene la replicación celular. Es específico de la fase S (*Rankin y Kaye, 1990*).

Análogos de las pirimidinas. Estas drogas interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos. El arabinósido de citosina (ara-C) análogo de la deoxicitidina, es el más representativo. Este antimetabolito pasa a su forma trifosfatada (ara-CTP), e inhibe a la ADN-polimerasa, deteniendo la síntesis de ADN. Es específico de la fase S (*González et al., 1992*). El 5-fluorouracilo (5-FU) es activado a FdUMP el cual interfiere con la síntesis de ADN por unión a la enzima timidilato sintetasa a la cual inactiva. El 5-FU es específico de ciclo pero no de fase (*Rankin y Kaye, 1990*).

Análogos de las purinas. Los más representativos son la 6-mercaptopurina (6-MP) y la 6-tioguanina (6-TG). Ambos se convierten en nucleótidos activos gracias a la acción de la enzima hiposantina-guanina fosforibosil-transferasa (HGPRT). La actividad citotóxica la ejercen a través de determinadas rutas metabólicas, principalmente inhibiendo la síntesis de nucleótidos de purina (*Rankin y Kaye, 1990*).

I.3.2.- Antibióticos antitumorales.

Este grupo de agentes produce su efecto por unión con el ADN, intercalándose entre los pares de bases.

Antraciclinas. Las más utilizadas son la doxorubicina, la daunomicina y la idarrubicina. Actúan en varios niveles. Tienen capacidad de unirse al ADN e intercalarse en él. Actúan como quelantes de cationes divalentes, interfieren en la síntesis de ARN preribosomal, en reacciones redox y se unen a la membrana plasmática alterando la permeabilidad celular (*González et al., 1992*) y además pueden generar radicales libres intracelulares y unirse a la topoisomerasa de ADN (*Rankin y Kaye, 1990*).

Bleomicina. Consiste en una mezcla de glicopeptidos originalmente aislados de *Streptomyces verticillus* (*Rankin y Kaye, 1990*). Produce roturas en las cadenas de ADN, a consecuencia de la formación de radicales libres, inhibiendo la síntesis. El efecto citotóxico máximo lo produce sobre células que se encuentran en la fase G₂ del ciclo celular (*González et al., 1992*).

Mitoxantrone. Es una antraquinona que ejerce su efecto citotóxico al unirse al ADN e intercalarse entre sus bases (*Rankin y Kaye, 1990*).

Actinomicina D (dactinomicina). Es una molécula aislada de *Streptomyces*. Se intercala entre los pares de bases guanina y citosina, bloqueando la transcripción de ADN a altas dosis y bloquea la síntesis directa de ARN a bajas dosis (*Rankin y Kaye, 1990*).

Mitomomicina C. Es una molécula sintetizada por especies del género *Streptomyces*. Inhibe la síntesis de ADN por entrecruzamiento y alquilación del ADN, por lo que puede ser considerada también, como agente alquilante (*Rankin y Kaye, 1990*).

I.3.3.- Agentes alquilantes.

Estos compuestos producen sus efectos por la adición de un grupo alquilo (R-CH₂-) mediante el establecimiento de fuertes uniones covalentes con residuos nucleofílicos del ADN y con proteínas asociadas a éste. Sólo tienen actividad citotóxica sobre células que se dividen activamente, es decir son cicloespecíficos. Los agentes alquilantes que producen dos o más alquilaciones son más citotóxicos que los compuestos monofuncionales a causa de la cantidad extra de entrecruzamiento en el ADN que producen. El daño provocado en el ADN es mayor durante la fase de síntesis probablemente porque la célula tiene menos tiempo en reparar el daño provocado. El cisplatino reacciona con el ADN originando puentes intracatenarios e intercatenarios (*Rankin y Kaye, 1990*).

I.3.4.- Alcaloides vegetales.

Colchicina. Es un alcaloide obtenido del *Colchicum autumnale* y que no se ha empleado con éxito en quimioterapia.

Los principales son los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina y vindesina) y las epipodofilotoxinas (etoposido y tenoposido).

Alcaloides de la vinca. Se extraen de la pervinca *Catharanthus roseus*. Son venenos mitóticos que se unen a la tubulina, proteína de los microtúbulos celulares. Estos alcaloides bloquean las subunidades A y B de la tubulina previniendo la formación del huso mitótico y bloqueando la mitosis en metafase. Actúan en la fase M del ciclo celular (*Rankin y Kaye, 1990*).

- Vincristina: Inhibe la formación del huso mitótico.
- Vinblastina: Además del efecto anterior, interfiere con el metabolismo de los aminoácidos que conduce del ácido glutámico al ciclo del ácido cítrico y urea (*González et al., 1992*).
- Vindesina: Este es un alcaloide semisintético con un espectro de actividad y toxicidad similar a los otros alcaloides.

Epipodofilotoxinas. Estas drogas son derivados semisintéticos de extractos de *Podophyllin peltatum*. Son fase específicos. Bloquean el ciclo celular en la interfase S-G₂ a bajas concentraciones y a altas dosis afectan a la fase G₂ (González et al., 1992).

I.3.5.- Miscelánea.

Entre los agentes más destacados dentro de este grupo se encuentran:

Hidroxiurea. Inhibe la enzima ribonucleótido difosfato reductasa, bloqueando el paso de ARN a ADN. Interfiere en la síntesis de ADN, por lo que es un agente específico de la fase S (Rankin y Kaye, 1990).

L-asparaginasa. Esta enzima es producida por *Escherichia coli* y *Erwinia carotovora*. Cataliza la hidrólisis de la asparagina a ácido aspártico y amonio (González et al., 1992), por lo que actúa privando de asparagina a aquellas células tumorales incapaces de sintetizarla o que producen bajos niveles de asparagina sintetasa (Rankin y Kaye, 1990).

Procarbazina. Esta droga es un débil inhibidor de la monoamina oxidasa, la cual inhibe la acción del ARN y ADN y disminuye la síntesis de proteínas (Rankin y Kaye, 1990). En su mecanismo de acción se ven involucradas reacciones de metilación y posiblemente intervienen radicales libres intermediarios (González et al., 1992).

M-amsa. Es un derivado sintético de las acridinas. Su mecanismo de acción no se conoce con exactitud (González et al., 1992).

I.4.- EL FENOTIPO DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES DROGAS (MDR).

Las dos principales manifestaciones de la resistencia a drogas son: resistencia intrínseca, la cual está relacionada con el fallo de la quimioterapia inicial y resistencia adquirida en la que inicialmente el tumor responde a la quimioterapia pero más tarde se vuelve resistente al tratamiento inicial y además a la terapia con otras drogas diferentes (*Kirschner et al., 1992; Brian et al., 1993; Schimke, 1986*).

Los mecanismos de resistencia observados en células MDR son (*Perez et al., 1993; Lum et al., 1993; Johnson et al., 1993*):

- Disminución en la acumulación intracelular de droga.
- Sobreexpresión de la Gp-P.
- Inactivación metabólica de drogas, mediada por glutatión (GSH).
- Resistencia mediada por topoisomerasas.
- Reparación y/o tolerancia al daño celular inducido por drogas.

En la tabla I.3 se sumarizan los mecanismos de resistencia a la quimioterapia (*Perez et al., 1993*); los cuales corresponden a factores del hospedador, del tumor o celulares.

Tabla I.3.- Mecanismos de resistencia a la quimioterapia.

| |
|---|
| <p>1) Factores del hospedador: <i>Alteraciones farmacocinéticas</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Disminución en absorción-activación de droga- Aumento en excreción-degradación de droga- Alteración en proteínas de transporte <p>2) Factores del tumor: <i>Metástasis</i></p> <p>3) Factores celulares: <i>Disminución en acumulación de droga</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Disminución del influjo- Aumento del eflujo <p><i>Alteraciones en metabolismo celular</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Disminución de la activación- Aumento de la degradación <p><i>Inactivación citoplásmica-nuclear</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Glutación- Metalotioneinas- ? Proteínas <p><i>Reparación de DNA</i> <i>Tolerancia al DNA dañado</i> <i>Alteración en los objetivos celulares</i></p> |
|---|

Obtenido de Pérez *et al.*, (1993).

I.4.1.- Disminución del acúmulo intracelular de drogas en células MDR.

La resistencia a múltiples drogas está asociada con una reducción en la acumulación intracelular de drogas (*Kirschner et al., 1992; Biedler, 1992; Roninson, 1992*), al comparar las líneas celulares MDR con sus respectivas líneas parentales sensibles (*Johnson et al., 1993; Ozols, 1992*). La causa puede ser porque la célula sea menos permeable a la droga o ésta sea expulsada al exterior (*Masters, 1990*). Además, se ha visto que la acumulación de droga está inversamente relacionada con el incremento de resistencia que se produce en una selección secuencial (*Bradley et al., 1988*).

Para explicar este fenómeno se propusieron dos mecanismos diferentes:

- Las drogas entran en la célula de forma normal, pero son eliminadas por la acción de una bomba extrusora, dependiente de energía, que opera con gran capacidad en células multirresistentes (*Biedler, 1992*).
- Una barrera de permeabilidad dependiente de energía controla la droga que entra en las células, la cual actúa con gran eficacia en células resistentes (*Bradley et al., 1988*).

Se piensa que la disminución intracelular de drogas es el resultado del aumento de actividad de una bomba extrusora (*Hait y Aftab, 1992*) dependiente de energía (*Biedler, 1992; Roninson, 1992; Brian et al., 1993*), ya que utilizando inhibidores de la fosforilación oxidativa en medio deficiente en glucosa, se produce un incremento en los niveles de droga intracelulares, similar a los observados en células sensibles (*Masters, 1990*).

Por otro lado, parece ser que el influjo de drogas, atribuido a mecanismos de difusión pasiva y transporte mediado, no se ve alterado en células MDR; si bien, en líneas celulares sensibles y resistentes de hámster chino, el eflujo de drogas inhibe al influjo, observándose un efecto mayor en células resistentes a múltiples drogas. Este hecho sugiere que las vías de influjo y eflujo interaccionan y no son completamente independientes. Parece ser que ambos mecanismos propuestos (bomba extrusora y barrera de permeabilidad) no son mutuamente excluyentes (*Bradley et al., 1988*).

No todas las drogas se ven involucradas en el fenotipo MDR. Todos los regímenes quimioterápicos de primera generación usados contenían al menos dos drogas no extruídas por la Gp-P; por lo que ha habido una tendencia hacia el diseño de regímenes de quimioterapia combinada de segunda y tercera generación, que incluyen agentes que no son eliminados por la Gp-P (*Niehans et al., 1992*).

I.4.2.- Resistencia cruzada a las drogas antineoplásicas.

La resistencia a múltiples drogas ha sido observada tras la exposición de células tumorales a concentraciones crecientes de actinomicina D, produciéndose resistencia no sólo al agente de selección, sino también a otras drogas no relacionadas y con mecanismos de acción diferentes (*Biedler y Riehm, 1970*); entre las que se encuentran los alcaloides de la vinca, colchicina, taxol, antraciclinas, epipodofilotoxinas, puromicina, trimetrexato, gramicidina D,...etc (*Chatterjee et al., 1990; Niehans et al., 1992; Roninson, 1992*).

Una de las causas que define al fenotipo MDR es la resistencia cruzada que presentan estas células a múltiples compuestos (*Ozols, 1992*), que no tienen relación alguna ni estructural ni funcionalmente con el agente seleccionador de esa resistencia. En la tabla I.4 se relacionan las drogas quimioterapéuticas asociadas con la resistencia a múltiples drogas (*Brian et al., 1993*).

Tabla I.4.- Drogas quimioterapéuticas asociadas con el fenotipo MDR.

| |
|--|
| Daunorubicina, Doxorubicina, Idarubicina, Vincristina, Vinblastina, Etoposido, Taxol, Dactinomicina, Mitoxantrone, Mitomicina C, Trimetrexato, Colchicina |
|--|

MDR: Resistencia a múltiples drogas.

Obtenido de Brian *et al.*, (1993); Mehta *et al.*, (1992); Ford y Hait, (1990).

Los productos naturales involucrados en la multiresistencia incluyen muchas drogas antineoplásicas como los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina, idarubicina), epipodofilotoxinas (etoposido, teniposido), mitoxantrone, taxol y otros (Lum *et al.*, 1993). Estas drogas aunque comparten resistencia cruzada con células MDR tienen estructuras químicas y mecanismos de acción diferentes. La mayoría son productos naturales lipofílicos que contienen estructuras en anillo complejas y grupos de nitrógeno cargados positivamente (Lum *et al.*, 1993).

La disminución intracelular de drogas ha sido observada en experimentos con drogas marcadas, los cuales sugieren que la causa por la cual se produce es por una disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática, como mecanismo principal de resistencia y resistencia cruzada (Bech-Hanson *et al.*, 1976).

Los mecanismos de acción de las drogas involucradas en este fenómeno son muy variados. El fenómeno de multiresistencia se ha observado en líneas celulares de hámster, ratón y humano, seleccionadas con colchicina, vincristina, vinblastina, daunorubicina, adriamicina y actinomicina D (Biedler *et al.*, 1975). Las líneas celulares MDR seleccionadas con diferentes drogas dentro de este amplio grupo (tabla I.4), normalmente muestran el mismo espectro de resistencia cruzada (Roninson, 1992); por lo que parece ser que estas drogas parecen compartir un mecanismo de resistencia común (Roninson, 1992; Masters, 1990). Cuando la selección de resistencia se realiza de forma secuencial y progresiva se obtienen sublíneas celulares múltirresistentes cuya resistencia cruzada se incrementa proporcionalmente a la que presentan frente al agente seleccionador. Esto sugiere que la resistencia a múltiples drogas es el resultado de la expresión de un único gen o varios genes regulados conjuntamente (Brian *et al.*, 1993). Sin embargo, los patrones de resistencia

cruzada que resultan de la selección con diferentes drogas son distintos, incluso si se usa el mismo tipo celular como línea parental (*Chatterjee et al., 1990; Roninson, 1992*). Los niveles más altos de resistencia corresponden, usualmente, al agente de selección (*Masters, 1990*). Sin embargo, en algunas ocasiones la resistencia cruzada a una droga es mayor que la observada para la droga de selección (*Biedler, 1992*). El grado de resistencia a agentes estructuralmente similares, ej. vinblastina y vincristina es, a menudo, diferente. La mayoría de las drogas involucradas en el fenotipo MDR son compuestos anfipáticos de alto peso molecular (*Bradley et al., 1988*).

I.4.3.- Sobreexpresión de la glicoproteína-P.

El estudio de las alteraciones en la respuesta a diversos compuestos y la comparación de las membranas celulares de células sensibles y multirresistentes (MDR), han puesto de manifiesto cambios en la estructura y función de la membrana plasmática (*Masters, 1990*). El hallazgo más importante, descubierto en células de hámster chino resistentes a colchicina (*Biedler, 1992*), ha sido la sobreexpresión de una glicoproteína de alto peso molecular (170 kDa) (*Harris y Hochhauser, 1992*), denominada glicoproteína-P o glicoproteína P-170 (*Bradley et al., 1988; Masters, 1990; Sonneveld et al., 1992; Brian et al., 1993; Perez et al., 1993*). Se han observado un gran número de similitudes entre moléculas de Gp-P de diferentes líneas celulares, tales como glicosilación, fosforilación,...etc (*Kirschner et al., 1992*). La sobreexpresión de esta proteína (*Fojo, 1991; Hait y Aftab, 1992*), codificada por el gen MDR1, es la responsable de la disminución en el acúmulo intracelular de drogas antineoplásicas observado en células multirresistentes (*Gros et al., 1986; Roninson, 1992*). El grado de resistencia usualmente, pero no siempre, se encuentra correlacionado con los niveles de expresión de Gp-P cuando una línea celular se hace progresivamente más resistente *in vitro* (*Sonneveld et al., 1992; Biedler, 1992; Endicott y Ling, 1989*).

La Gp-P se conserva en tamaño y reactividad inmunológica entre especies y en todas ellas se encuentra asociada con la resistencia a múltiples drogas.

Se ha observado una pequeña pero consistente diferencia en el peso molecular aparente de la Gp-P en sublíneas celulares diferentes seleccionadas frente a colchicina y daunorubicina. De esta forma, los análisis realizados a Gp-P (150-180 kDa) de varias

sublíneas MDR de hámster, seleccionadas con distintas drogas, dan como resultado una heterogeneidad en el tamaño y carga; sugiriendo la existencia de una familia de moléculas relacionadas (*Kirschner et al., 1992*). Estas glicoproteínas de membrana son completamente análogas a la Gp-P. La conservación de la estructura molecular de esta glicoproteína entre especies de mamíferos y su detección a bajos niveles en líneas celulares sensibles a drogas indican que debe ser un importante componente de la membrana plasmática de estas células (*Bradley et al., 1988*).

Se ha encontrado expresión de Gp-P a altos niveles en tejidos normales de hígado, páncreas, riñón (túbulos renales), colon, yeyuno y cortex adrenal (*Fojo et al., 1987; Bradley et al., 1988; Lum et al., 1993*). Esto sugiere que pueda tener un papel fisiológico en procesos de secreción. En tejidos tumorales se ha visto que la correlación entre el incremento de expresión de Gp-P y la resistencia a múltiples drogas debe ser la causa del fenotipo MDR (*Bradley et al., 1988*).

I.4.4.- Reversión de la resistencia a múltiples drogas.

Las estrategias para revertir la resistencia a las drogas incluyen (*McGuire, 1992; Perez et al., 1993*):

- Intensificación de dosis.
- Inhibición de la Gp-P.
- Inhibición de la síntesis de GSH.
- Inhibición de la reparación del ADN.

La resistencia a múltiples drogas se puede revertir *in vitro* mediante diferentes agentes en combinación con las drogas citotóxicas (*Masters, 1990*). Existen diversos grupos de compuestos que revierten o modulan, en células MDR, la disminución en la acumulación de drogas (tabla I.5) (*Lum et al., 1993; Masters, 1990; Beck y Qian, 1992*).

Tabla I.5.- Moduladores o revertidores del fenotipo MDR.

| |
|--|
| Inhibidores de la calmodulina <i>Fluphenazina, trifluoperazina, cis-flupenthixol, trans-flupenthixol</i> |
| Bloqueadores de canales de calcio <i>Verapamil, diltiazem, nifedipina, nifedipina, nicardipina, nimodipina, bepridil</i> |
| Agentes activos de membrana Anestésicos locales <i>Lidocaina</i> Detergentes no iónicos <i>Tween 80</i> |
| Ciclosporinas <i>Ciclosporina A, SDZ PSC-833</i> |
| Antraciclinas inactivas y alcaloides de la vinca |
| Reserpina |
| Agentes antimalaria <i>Quinina, quinicrina</i> |
| Antibióticos <i>Cefoperazona, ceftriaxona, eritromicina</i> |
| Esteroides y antagonistas esteroideos <i>Tamoxifen, toremifina, progesterona, acetato de megestrol</i> |
| Drogas cardiovasculares <i>Diyridamole, quinidina, amiodarone</i> |
| Megestrol |
| Miscelánea <i>Taxol y doxorubicina en liposomas,</i> <i>Terfenidina, factor de necrosis tumoral, retinoides,</i> <i>antidepresivos tricíclicos, FK 506, SDZ 280-446</i> Anticuerpos monoclonales <i>MRK16, VIC-2</i> |

MDR: Resistencia a múltiples drogas.

Obtenido de Brian *et al.*, (1993); Lum *et al.*, (1993); Masters, (1990); Bradley *et al.*, (1988).

Algunos de estos agentes (verapamil, quinidina, amiodarone) bloquean la unión de las drogas a la Gp-P. El concepto de usar un compuesto no tóxico para aumentar el efecto letal de una droga quimioterapéutica o revertir la resistencia a la droga es un tema de intenso estudio. El principal problema lo constituye el efecto que la combinación de agentes puede producir y el fallo debido al aumento de toxicidad en los tejidos normales (*Chabner y Fojo, 1989; Stewart y Evans, 1989*).

La concentración requerida de algunas drogas para revertir el fenotipo MDR *in vitro* puede producir toxicidad *in vivo*, lo que constituye la mayor limitación para el uso clínico efectivo. Algunos de estos agentes probablemente actúan mediante unión a la Gp-P, causando una acumulación intracelular de droga. Otros agentes pueden actuar por unión a la calmodulina, o por el contrario no afectar al eflujo de droga pero sí causar una redistribución en la célula (*Harris y Hochhauser, 1992; Stewart y Evans, 1989*). A continuación se detallan algunos de ellos.

Bloqueadores de canales de calcio.

Este es el primer tipo de agentes quimiosensibilizadores que modulan la función de la Gp-P en pacientes (*Lum et al., 1993*). El más importante de ellos es el verapamil (fig. I.8). El mecanismo por el cual el verapamil modula la resistencia a drogas es por una inhibición competitiva de la Gp-P. Este agente compite con las drogas antitumorales por los puntos de unión específicos, ya que ambos son capaces de unirse directamente a la Gp-P (*Biedler, 1992*). El verapamil y los bloqueadores de canales de calcio presentan un efecto importante sobre el influjo de iones a través de la membrana, ya que previenen el eflujo de drogas al exterior celular (*Bowles et al., 1990*). Actúan como un sustrato de la Gp-P, participando así en el eflujo activo y por consiguiente inhiben competitivamente el eflujo de drogas citotóxicas (*Chatterjee et al., 1990*). Un aumento de la concentración de verapamil puede conducir a un incremento en la acumulación de droga intracelular en líneas MDR *in vitro* (*Bowles et al., 1990; Perez et al., 1993*). En 1991, Miller usó un método inmunohistoquímico, mediante los anticuerpos monoclonales JSB-1 y C-219, para demostrar la expresión de Gp-P en pacientes con linfomas que presentaban resistencia a drogas. La dosis de verapamil máxima tolerada ha sido usada para incrementar la eficacia de doxorubicina y vincristina en pacientes que presentaban resistencia a drogas. Un estudio realizado por Miller *et al.*, (1991), mostró que el 72 % de los pacientes respondió a

tratamientos con ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona combinada con verapamil. La toxicidad que observaron fue seria: fallo cardiaco, hipotensión y arritmias cardiacas. Concluyeron con que sería necesario un modulador menos tóxico y más efectivo que verapamil para combinarlo con la quimioterapia inicial (*Miller et al., 1991*). El eflujo de vinblastina en células epiteliales MDR se revierte mediante verapamil, con un aumento de la fosforilación de Gp-P; y además, el verapamil potencia la toxicidad de bleomicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. En un estudio realizado en células de carcinoma renal humano, se ha demostrado que el verapamil provoca un aumento significativo de la citotoxicidad de la vinblastina, pero se requieren altas concentraciones ($1\mu\text{M}$) (*Harris y Hochhauser, 1992*). Los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el esteroisómero (+ ó R) del verapamil es 10 veces menos potente como antagonista del calcio que el isómero (- ó S). Sin embargo, los enantiomeros quirales son aproximadamente igual de efectivos en el incremento de la concentración intracelular de drogas antitumorales. Se está estudiando clínicamente el isómero R del verapamil como el mejor modulador selectivo de la resistencia a múltiples drogas (*Höllt et al., 1992*). Además, existe una gran variedad de esteroisómeros con estructura de fenil-alkilamina y dihidropiridina que difieren marcadamente en su potencia como antagonistas del calcio. Concretamente, se han observado mayores diferencias de potencia en las series de drogas de dihidropiridina y en los isómeros de nifedipina. El esteroisómero (-) nifedipina muestra una afinidad 45 veces menor que la (+)nifedipina, por los puntos de unión de los canales de calcio; pero es igual de potente en la inhibición del transporte de drogas por Gp-P y en la reversión de resistencia a drogas (*Brian et al., 1993*). Por otro lado el verapamil provoca un incremento en la fosforilación de la Gp-P, lo que da como resultado una inhibición del eflujo de droga (*Bowles et al., 1990*).

Es posible que usando una combinación de diferentes antagonistas MDR a bajas dosis, tales como tamoxifen con verapamil, pudiera revertirse la resistencia salvando la toxicidad que provocan las altas concentraciones de cada droga por separado (*Harris y Hochhauser, 1992*).

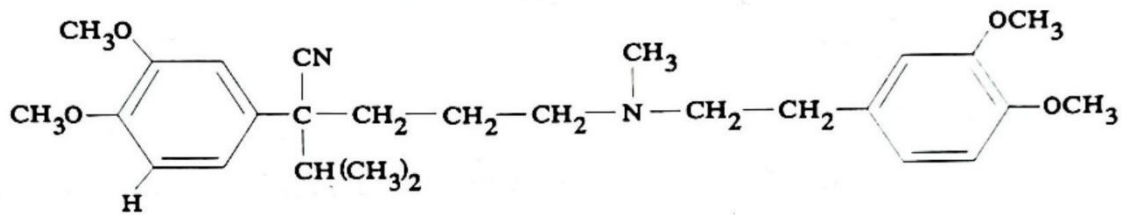


Figura I.8.- Estructura química del verapamil (Pirker et al., 1990).

Ciclosporinas.

La ciclosporina A (CsA), trifluoperazina, quinina y tamoxifen, igual que el verapamil, son transportadas por la Gp-P e inhiben competitivamente el eflujo de droga, revirtiendo la resistencia a múltiples drogas en células y modelos animales (Sonneveld et al., 1992; Slater et al., 1986). El modulador más potente observado en tumores MDR transplantados a animales es la ciclosporina; y particularmente el análogo de la ciclosporina D, PSC 833, y el péptido hidrofóbico SDZ 280-446 (Loor et al., 1992). La toxicidad que se ha observado *in vivo* es hiperbilirubinemia reversible, hipomagnesemia e hipertensión.

La ciclosporina incrementa la concentración de doxorubicina y vincristina en células resistentes (Sonneveld et al., 1992). Se espera que análogos de ciclosporina más selectivos tengan mejores resultados terapéuticos en la reversión de la resistencia a múltiples drogas (Brian et al., 1993).

Agentes hormonales

Por último, se han usado otros agentes para modular la resistencia a drogas, como el tamoxifen, progesterona (Qian y Beck, 1990; Chatterjee y Harris, 1990), megestrol, entre otros muchos (Lum et al., 1993). El tamoxifen y su mayor metabolito el N-desmetiltamoxifen a concentraciones de 4-6 μM aumenta la concentración intracelular de drogas antineoplásicas y aumenta *in vitro* la citotoxicidad de estos agentes entre 3-10 veces. En algunos ensayos clínicos se ha demostrado que altas dosis de tamoxifen, capaces de alcanzar concentraciones en plasma que inhiben la función *in vitro* de la Gp-P, pueden ser administradas con seguridad en combinación con vinblastina (Brian et al., 1993). Estas

drogas parecen ser buenas candidatas para su uso en combinación con otros agentes revertidores de MDR (*Harris y Hochhauser, 1992*).

En muchos ensayos clínicos se revierte la resistencia a múltiples drogas por coadministración de inhibidores no citotóxicos de la Gp-P. Sin embargo, estos ensayos están limitados por los siguientes factores (*Brian et al., 1993*):

- Inhabilidad para alcanzar concentraciones adecuadas del agente modulador a causa de la toxicidad.
- Los niveles de modulador y citotoxina no son medidos en algunos casos, lo que hace difícil evaluar las consecuencias farmacocinéticas de la interacción producida entre las drogas.
- La biodisponibilidad del agente modulador *in vivo* puede ser afectada por proteínas del suero.
- A menudo no se incluyen controles adecuados (resistencia clínica previa a la terapia, o grupo control aleatorio sin el modulador).
- La no detección de la expresión del gen MDR1 en células tumorales.
- Pueden estar presentes en las células tumorales mecanismos de resistencia múltiple diferentes al fenotipo MDR.

La importancia pronóstica de la expresión del gen MDR1 y la observación de las remisiones con modulación de la resistencia a múltiples drogas ha contribuido a mantener el interés en este área (*Brian et al., 1993*).

Otros agentes

Otros agentes utilizados en la reversión de MDR incluyen a quinina, quinidina, trifluoperazina, proclorperazina y cefoperazona (*Lum et al., 1993*). No se sabe si las concentraciones en suero de estos moduladores son suficientes como para alterar significativamente la función de la Gp-P en pacientes (*Brian et al., 1993*).

I.4.5.- Otros cambios celulares correlacionados con la resistencia a múltiples drogas.

Se ha visto que líneas celulares multirresistentes presentan un amplio espectro de alteraciones bioquímicas (tabla I.6).

En numerosas líneas celulares multirresistentes se ha detectado la presencia de una pequeña proteína citosólica de 19 - 22 kDa a la que se denominó sorcin, y de la que existen varios tipos. Así, sorcin/V19 ha sido identificada como una pequeña proteína citosólica sobreexpresada en líneas celulares MDR seleccionadas con viscristina. Esta proteína se conserva en tamaño y reactividad inmunológica en gran número de especies y está presente en gran variedad de líneas celulares MDR seleccionadas con vincristina, actinomicina-D, colchicina y adriamicina. Otra proteína importante, también sobreexpresada en líneas multirresistentes, es la sorcin/CP₂₂ (*Bradley et al., 1988*).

Existe una relación muy estrecha entre la sobreexpresión de la Gp-P y las proteínas sorcin. El gen que codifica para las proteínas sorcin está estrechamente yuxtapuesto al gen de la Gp-P, tanto en genomas de hámster como humanos. Además, la sobreexpresión del gen sorcin parece ser el resultado de su co-amplificación junto con el gen de la Gp-P. Por otro lado, la sobreexpresión y amplificación del gen sorcin en células MDR no es necesaria para el desarrollo de multirresistencia; aunque en gran número de líneas celulares resistentes se indica que puede ser un importante modulador del fenotipo MDR (*Bradley et al., 1988*).

Tabla I.6.- Cambios bioquímicos en líneas celulares MDR.

| ALTERACION | LINEA CELULAR | DROGAS SELECCION |
|--|---|--------------------------------|
| <u>Proteínas/polipéptidos</u> | | |
| 1) Aumento Gp membrana 170 kDa (Gp-P) | 1) Células <i>mdr</i> hámster, ratón y humano | |
| 2) Aumento Gp de membrana 150-180 kDa | 2) Células CHL | 2) ACT-D, VCR ó DNR |
| 3) Aumento Gp 170-190 kDa | 3) Linfoblastos humanos | 3) VBL |
| 4) Aumento Pm 180 kDa (P-180) | 4) Células CHL | 4) ADR |
| 5) Aumento fosfoglicico-proteína 130-150 kDa | 5) Macrófagos de ratón | 5) CCH, VBL ó Taxol |
| 6) Disminución Gp de superficie 100 kDa | 6) Células CHL | 6) ACT-D, VCR ó DNR |
| 7) Disminución proteína membrana 100 kDa. Aumento proteína membrana 220 kDa | 7) Células CHL | 7) ADR |
| 8) Disminución Gp de membrana 75-85 kDa | 8) Linfoblastos leucemia humana | 8) VBL |
| 9) Disminución Gp de membrana 70-80 kDa | 9) Células Meta/KB humanas | 9) CCH, VBL ó ADR |
| 10) Aumento proteína citosólica 19 kDa (sorcin/V19) | 10) Células <i>mdr</i> de ratón, hamster y humano | 10) VCR, ACT-D, CCH y ADR |
| 11) Aumento proteína citosólica 22 kDa (CP ₂₂) | 11) EMT6 de ratón y células CHO | 11) ADR y CCH, respectivamente |
| 12) Aumento proteína 21 kDa (p21) | 12) Células SEWA de ratón | 12) ACT-D ó VCR |
| 13) Aumento proteína 22 kDa (p22) | 13) Células de hámster y L de ratón | 13) CCH ó ADR y CCH, resptm |
| 14) Aumento proteína ácida 21 kDa | 14) HeLa/KB humanas | 14) CCH |
| 15) Aumento de glutatión | 15) Carcinoma de ovario humano A2780 | 15) ADR |
| <u>Actividad enzimática</u> | | |
| 1) Aumento actividad glicosil-transferasa. Disminución actividad glicosidasa | 1) Células CHL | 1) ACT-D |
| 2) Aumento actividad fosfatasa alcalina | 2) Neuroblastoma de ratón | 2) ADR, VCR |
| 3) Aumento actividad 5'-nucleotidasa | 3) P388 de ratón | 3) ADR |
| 4) Aumento actividad glutatión transferasa y peroxidasa | 4) CMF-7 y humanas | 4) ADR |
| 5) Aumento actividad glutatión transferasa | 5) Células SEWA de ratón | 5) ACT-D ó DNR |
| <u>Lípidos de la membrana plasmática</u> | | |
| 1) Simplificación en composición de gangliósidos | 1) Células CHL | 1) ACT-D ó DNR |
| 2) Disminución tasa de fosfatidilcolina en esfingomielina | 2) P388 de ratón | 2) Antraciclinas |

ACT-D: Actinomicina D. ADR: Adriamicina. CCH: Colchicina. DNR: Daunorubicina. VCR: Vincristina. VBL: Vinblastina. CHL: Pulmón de hámster chino. CHO: Ovario de hámster chino. Gp: Glicoproteína. Obtenido de Bradley *et al.*, (1988); modificado.

De entre todas las alteraciones, es la actividad glutatión-S transferasa de particular interés debido a dos razones:

- La glutatión-S transferasa (GST) puede proteger a las células contra el daño provocado por los radicales libres; uno de los mecanismos de actuación de las antraciclinas. De esta forma, el aumento en la actividad GST contribuye a la resistencia a drogas en las células MDR.
- En procesos de carcinogénesis química se han encontrado niveles elevados de actividad GST, por lo que puede influir en el desarrollo de la resistencia múltiple en tumores inducidos.

En líneas celulares multirresistentes se han encontrado niveles de glutatión más altos que en las líneas parentales sensibles. Por otro lado, una reducción parcial de los niveles de glutatión, mediante el uso de inhibidores de su síntesis, no provoca un aumento de la citotoxicidad de las drogas antineoplásicas (*Masters, 1990; Bradley et al., 1988*).

También se han observado, en líneas MDR, cambios físicos y biológicos a nivel celular, como el conocido como "transformación reversa", por el que estas líneas presentan alteraciones en sus características de crecimiento *in vitro* y una menor tumorigenicidad (*Biedler, 1992*).

Entre las características físicas alteradas se encuentra la susceptibilidad a la disrupción mecánica, el incremento y decremento en la fluidez de la membrana plasmática, el incremento en la tasa de endocitosis (*Bradley et al., 1988*), incremento en el número de receptores del factor de crecimiento epidérmico, simplificación en la expresión de gangliósidos (*Beck, 1987*), así como disminución en la incorporación de drogas a la célula por cambios provocados en la composición de la membrana lipídica (*Brian et al., 1993*).

I.5.- GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES DROGAS.

I.5.1.- Clonación del gen de la glicoproteína-P y de su ARNm.

La clonación del gen MDR se ha realizado por separado en células de ratón, hámster y humano. Se ha descubierto más de un gen en cada especie. Al gen humano que codifica para la Gp-P se le denomina MDR1 (*Perez et al., 1993*). Es uno de la gran familia génica que codifica para proteínas de transporte, altamente conservadas en la evolución, y juega un papel similar en el transporte de sustancias hacia dentro y fuera de las células (*Masters, 1990*).

Mediante el estudio de células multirresistentes seleccionadas con colchicina se ha podido comprobar que la alteración en un único gen (*Roninson, 1992*) o en un pequeño número de genes estrechamente ligados, constituye la base del fenotipo de resistencia a las drogas de selección (*Harris y Hochhauser, 1992*), resistencia cruzada a otras drogas no relacionadas, sensibilidad colateral a agentes activos de membrana y la sobreexpresión de la glicoproteína de membrana P-170. Estos hechos están firmemente corroborados con:

- Los clones seleccionados independientemente con colchicina, y en un único paso, desarrollan el fenotipo MDR en su totalidad.
- Los revertientes aislados en un sólo paso sin tratamiento mutagénico, muestran pérdida de resistencia y sobreexpresión de Gp-P (*Brian et al., 1993*).
- La Gp-P y el fenotipo MDR se expresan en células somáticas híbridas codominantes.
- Al transferir ADN procedente de células MDR a células sensibles y posterior obtención de clones independientes, se obtiene el fenotipo MDR.

Se ha visto que un sólo evento génico es suficiente para obtener el fenotipo MDR.

El crecimiento de líneas celulares en concentraciones crecientes de agentes citotóxicos da como resultado la selección de sublíneas celulares que muestran una

amplificación del gen MDR1 y la sobreexpresión de su producto, la Gp-P (*Niehaus et al., 1992*).

La Gp-P se sobreexpresa en una gran variedad de líneas celulares multirresistentes de roedores y humanos, siempre en proporción al grado de resistencia. Los bajos niveles de expresión de Gp-P encontrados en células parentales sensibles a drogas y el progresivo incremento en multirresistencia y expresión de esta glicoproteína, tras múltiples pasos de selección, parecen estar más en consonancia con la existencia de un mecanismo de amplificación génica de la Gp-P.

El clonaje y caracterización de genes amplificados y sobreexpresados en diferentes células multirresistentes revela que todos ellos codifican para la Gp-P. Así, la amplificación génica y sobreexpresión de esta glicoproteína parecen ser las alteraciones predominantes en células resistentes a múltiples drogas (*Bradley et al., 1988*).

Se han encontrado niveles de ARNm MDR1 en la mayoría, pero no en todos, los tumores resistentes a drogas, derivados de tejidos que normalmente presentan altos niveles de Gp-P; incluyendo glándula adrenal, riñón, hígado, colon y recto, y que no habían sido expuestos a quimioterapia previa (*Goldstein et al., 1989*). Entre estos tumores se incluyen el cáncer de colon, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma adrenocortical, feocromocoma, carcinoma de células en isleta, leucemias crónicas, meningiomas y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Estos tumores expresan el gen MDR1 y presentan una respuesta pobre a la quimioterapia. Tumores sensibles a la quimioterapia, como leucemias agudas, linfomas, neuroblastomas y carcinomas de ovario, mama y pulmón de células pequeñas no expresan, usualmente, el gen MDR1 (*Lum et al., 1993*). De forma similar los niveles de ARNm MDR1 son elevados en algunos tumores estudiados tras tratamientos con quimioterapia (*Goldstein et al., 1990*).

Se ha comprobado que al menos seis genes se amplifican y sobreexpresan en células MDR. De ellos, el único gen amplificado y sobreexpresado de forma consistente es el que codifica para la Gp-P; el resto son co-amplificados en algunas líneas celulares en las que su localización es contigua al gen de la Gp-P (*Bradley et al., 1988*).

Mediante el uso de las sondas de ADN (pMDR1 y pMDR2) se han analizado sublíneas celulares KB resistentes que habían sido seleccionadas con colchicina, vinblastina y adriamicina. Se ha visto que se amplifican, diferencialmente, secuencias homólogas a pMDR1 y pMDR2. Las secuencias pMDR1 se amplifican en todas las sublíneas celulares KB multirresistentes. Por el contrario, las secuencias pMDR2 sólo se amplifican en algunas sublíneas. Este hecho sugiere que pMDR1 y pMDR2 pueden formar parte de dos genes distintos pero relacionados, probablemente miembros diferentes de una familia multigénica. A estos genes se les denomina MDR1 y MDR2 (*Bradley et al., 1988; Riordan y Ling, 1985*).

Las líneas celulares multirresistentes sobreexpresan la Gp-P en proporción a su grado de resistencia, la cual está correlacionada con la sobreexpresión de ARNm y la amplificación de ADN (*Kirschner et al., 1992*). La transfección de ADNc desde células multirresistentes a drogas a células sensibles conlleva como resultado la sobreproducción de Gp-P por las células receptoras (*Bradley et al., 1988*).

I.5.2.- Sobreexpresión del ARNm de la glicoproteína-P y amplificación génica en células MDR.

En todas las líneas celulares estudiadas se ha visto que el desarrollo de multirresistencia está asociado con cantidades crecientes de ARNm para la Gp-P. Las líneas celulares muestran incrementadas entre 80-820 veces la expresión del ARNm MDR1 (*Brian et al., 1993*). El tamaño de este ARNm oscila entre 4,5 - 5 Kb y los altos niveles encontrados, se traducen en cantidades crecientes de Gp-P. Los incrementos de resistencia que se producen en líneas celulares expuestas a drogas conducen, en cada paso, a un mayor contenido en Gp-P y mayores niveles de ARNm (*Roninson, 1992*).

Las selecciones seriadas con colchicina, de células de ovario de hámster chino de la línea AuxB1, provocan un incremento del ARNm de la Gp-P, el cual está asociado con la amplificación progresiva del gen de la Gp-P, a cada paso de selección. Por el contrario, durante el desarrollo de multirresistencia en selecciones seriadas con colchicina sobre

sublíneas KB/HeLa, se han observado incrementos de ARNm de la Gp-P, sin incremento del número de copias del gen. Igualmente, en la línea celular de carcinoma de ovario humano SKOV₃, seleccionada con vinblastina o vincristina, los primeros pasos en el desarrollo de multirresistencia están asociados sólo al incremento de los niveles de Gp-P y de su ARNm. Otro ejemplo similar ocurre en sublíneas de leucemia P388 multirresistentes seleccionadas con adriamicina, vincristina o actinomicina-D; donde igual que en los casos anteriores, no se produce amplificación génica (*Bradley et al., 1988*).

Una gran variedad de agentes químicos afectan a la expresión del gen MDR1, principalmente al incremento de la transcripción. La línea celular HDP 46 de carcinoma renal sufrió un incremento de 8 veces en los niveles de ARNm MDR1 como respuesta al choque térmico, etanol, arsenito sódico y cadmio. Estos efectos no se han encontrado en todos los tipos celulares (*Harris y Hochhauser, 1992*).

Se han detectado bajos niveles de expresión de Gp-P en células sensibles a las drogas. El aislamiento y secuenciación de ADNc correspondiente a transcritos de Gp-P procedentes de células sensibles conduce a demostrar que:

- La Gp-P está codificada por una familia de genes. Se han detectado al menos dos miembros de esta familia génica (*Roninson, 1992*) expresados en diferentes líneas celulares y tejidos sensibles de hámster, ratón y humanos.
- Las diferencias entre los miembros de la familia génica de Gp-P se conservan entre las especies.
- Un ADNc de Gp-P obtenido de una línea celular sensible puede conferir el fenotipo MDR al ser transferido y sobreexpresado en un receptor sensible a las drogas.

Los análisis comparativos de las secuencias indican que estos clones corresponden a transcritos de dos miembros diferentes de la familia génica de Gp-P, denominados pgp1 y pgp2. Además, cada gen de Gp-P presenta dos puntos de poliadenilación, por lo que al menos se pueden expresar 4 transcritos de Gp-P simultáneamente en una línea celular sensible. Se ha identificado un tercer miembro de la familia génica de la Gp-P, denominándose pgp3 (*Bradley et al., 1988*).

I.5.3.- Organización cromosómica de genes MDR amplificados.

Mediante estudios de mapeo genético se ha podido comprobar que los genes MDR1 humanos se localizan en el cromosoma 7q21-31 (*Harris y Hochhauser, 1992; Biedler, 1992*). Se ha estudiado la genética molecular de los genes pgp nativos y amplificados de sublíneas MDR de hámster chino; encontrándose que los tres genes de la Gp-P están estrechamente ligados en el cromosoma 1q26 (*Jongsma et al., 1987*).

Los análisis de numerosas líneas celulares multirresistentes de hámster, ratón y humano, han demostrado que el desarrollo de multirresistencia está a menudo, pero no siempre, asociado con la amplificación y sobreexpresión del gen de la Gp-P (*Biedler, 1992; Roninson, 1992*). En las líneas celulares seleccionadas por incremento de multirresistencia, generalmente el nivel de amplificación génica está correlacionado con el grado de resistencia a drogas (*Bradley et al., 1988*). Las líneas celulares muestran a menudo una amplificación del gen MDR1 entre 10-100 veces (*Brian et al., 1993*).

La amplificación génica está asociada a anomalías citogenéticas como las estructuras cromosómicas aberrantes, detectables microscópicamente, manifestadas usualmente como regiones de tinción homogénea (HSR), regiones de bandeo anormales (ABR) de cromosomas metafásicos, o pequeños cuerpos pareados de cromatina extracromosómica denominados minutos dobles (DM) (*Kopnin, 1981; Baskin et al., 1981*).

La regulación de MDR1 por amplificación génica fue sugerida inicialmente por la presencia de DM y HSR (*Harris y Hochhauser, 1992*).

Las evidencias citogenéticas de la amplificación génica en células MDR han sido clarificadas por aislamiento y caracterización de secuencias amplificadas. Mediante estos estudios se ha comprobado que verdaderamente están amplificadas y que los genes amplificadas codifican para la Gp-P (*Biedler, 1992*).

La hibridación *in situ* con sondas apropiadas en cromosomas metafásicos ha mostrado inequívocamente que HSR y ABR, presentes a niveles elevados en células de hámster chino resistentes, son zonas de amplificación génica (*Jongsma et al., 1987*). De igual forma, la hibridación *in situ* con una sonda de ADNc, clonada y aislada de una línea tumoral de mama resistente a doxorubicina, ha revelado que las secuencias amplificadas están contenidas en las dos zonas HSR características de estas células (*Biedler, 1992*).

I.5.4.- Familia génica de la glicoproteína-P.

Mediante el uso de ADNc para el análisis del ADN genómico de células de hámster, ratón y humano se han revelado múltiples bandas en el ADN; corroboradas con la existencia de una familia génica de Gp-P (*Roninson, 1992; Biedler, 1992*).

Gracias a numerosos estudios se ha demostrado que existe una pequeña familia génica, compuesta de 2 genes en humanos y 3 en roedores (*Roninson, 1992; Harris y Hochhauser, 1992*) (tabla I.7). Se ha podido comprobar que para obtener el fenotipo MDR, incluyendo la elevada expresión de Gp-P, sólo es suficiente el gen humano MDR1 (clase I) o el correspondiente de ratón o hámster chino (clases I y II) (*Biedler, 1992*).

Tabla I.7.- Familia génica de la glicoproteína-P.

| Clase | Humano | Hámster chino | Ratón | |
|-------|--------|---------------|-----------|-----------|
| | | | Esquema A | Esquema B |
| I | MDR1 | pgp1 | mdr3 | mdr1a |
| II | – | pgp2 | mdr1 | mdr1b |
| III | MDR2/3 | pgp3 | mdr2 | mdr2 |

Obtenido de Biedler, (1992); Kirschner *et al.*, (1992).

El gen humano MDR1 puede conferir el fenotipo MDR completo. Sin embargo, el gen MDR3 (denominado también MDR2), no confiere el fenotipo MDR tras la transfección del mismo (Niehans *et al.*, 1992; Harris y Hochhauser, 1992). No obstante, el gen MDR2/3 aún puede ser importante clínicamente; ya que es altamente expresado en leucemias de células B promielocíticas, antes del tratamiento. Los estudios realizados con genes de roedores han dado resultados similares. Los genes de hámster pgp1 y pgp2 y ratón mdr3 (ó mdr1a) y mdr1 (ó mdr1b) (tabla I.7), los cuales son equivalentes u homólogos al gen humano MDR1 (Roninson, 1992), también confieren el fenotipo MDR (Harris y Hochhauser, 1992).

Recientemente se ha podido comprobar que a pesar de la homología en la secuencia de ADN de los genes de la clase I y II, los genes de roedores pgp3 y mdr2 (clase III) no contribuyen al fenotipo MDR (Biedler, 1992).

Las Gp-P humanas codificadas por los genes MDR1 y MDR2/MDR3 están estrechamente relacionadas, presentando hasta un 80 % de homología en sus dominios transmembranales (Niehans *et al.*, 1992).

El análisis de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para proteínas humanas de transporte transmembranales (ej.: regulador transmembranal en la fibrosis cística, la adenil-ciclase o proteínas de membrana de peroxisomas); así como la similitud estructural entre estas proteínas y otras de plantas y animales, ha conducido a la idea de la

existencia de una "superfamilia de transportadores de membrana" (Riordan *et al.*, 1990). Además, se ha observado que los miembros de esta familia génica se pueden amplificar diferencialmente durante la selección de multirresistencia. La explicación más fiable para esta amplificación diferencial es que los fragmentos de ADN amplificados en diferente extensión corresponden a miembros diferentes de la familia génica de Gp-P (Bradley *et al.*, 1988).

El amplicón de la glicoproteína-P.

Se han aislado seis clases de ADNc en el estudio de los genes de la multirresistencia, en la línea de ovario de hámster chino CH^RC5, correspondientes a seis genes que están amplificados y sobreexpresados. Se ha comprobado que el ADNc de la clase 2 codifica para la Gp-P; pero el significado funcional de los otros 5 genes dentro del fenotipo MDR todavía no está claro. En otros estudios realizados sobre sistemas biológicos diferentes se indica que la amplificación génica está a menudo acompañada de co-amplificación de genes adyacentes; de tal forma que puede haber un gradiente de amplificación, localizándose el mayor nivel cerca del punto medio del amplicón (Bradley *et al.*, 1988). El tamaño medio del amplicón de la Gp-P se ha estimado en 4,5-10,1 millones de pares de bases. Todos los genes co-amplificados que han sido identificados no necesariamente tienen que estar presentes en el amplicón. Además, cuando se coamplifican y coexpresan los genes *pgp1* y *pgp2*, no se conoce con certeza cuál de ellos contribuye al fenotipo MDR, o si por el contrario son los dos (Biedler, 1992). Los ADNc de las clases 1, 2 y 3 hibridan con un fragmento de ADN y los ADNc 4 y 5 con otro fragmento diferente. Estos dos grandes fragmentos de ADN parecen estar adyacentes, por lo que estos cinco genes probablemente se encuentran ligados en un gran segmento de ADN amplificado. Por otro lado, el gen de la clase 6 se encuentra ligado a los genes 4 y 5, y se localiza en el mismo segmento de ADN amplificado (Bradley *et al.*, 1988).

Se han observado dos niveles de amplificación para fragmentos de ADN que hibridan con los ADNc de la clase 1 a 5. En particular, el fragmento de la clase 2 (Gp-P) se subdivide en dos grupos que se amplifican a diferentes niveles, sugiriendo que pueden ser 2 genes de Gp-P. La familia génica de la Gp-P, constituida por tres miembros, está flanqueada por los genes 1, 3, 4 y 5. La posición del gen de la clase 6 no ha sido determinada, excepto

que se encuentra más estrechamente ligada a los genes de la clase 4 y 5 (*Bradley et al., 1988*).

El amplicón del gen de la Gp-P se selecciona durante la exposición a las drogas, resultando el fenotipo de multirresistencia; y los genes flanqueantes se co-amplifican a una extensión variable debido a su localización contigua a los genes de la Gp-P.

Los productos codificados por los genes co-amplificados no se conocen, excepto para el gen de la clase 4. Este gen codifica para una pequeña proteína citosólica fosforilada conocida como sorcin/V19. Esta proteína se sobreproduce en muchas, pero no todas las líneas celulares multirresistentes de hámster, humano y ratón, seleccionadas para resistencia a colchicina, alcaloides de la vinca, doxorubicina o actinomicida D. Los estudios de análisis de su secuencia en hámster indican que presenta homología con proteinasas dependientes de calcio y contiene unidades estructurales de unión al calcio. Es posible que la reversión parcial de la multirresistencia, mediante algunos bloqueadores de canales de calcio e inhibidores de la calmodulina, pueda estar ligada a la sobreproducción de la proteína sorcin (*Bradley et al., 1988*).

I.5.5.- Multirresistencia por transfección de ADN.

Varios estudios independientes han demostrado que la transfección con ADN de alto peso molecular procedente de células multirresistentes resulta en la expresión del fenotipo MDR en células receptoras sensibles a las drogas (*Sonneveld et al., 1992; Biedler, 1992; Masters, 1990; Bradley et al., 1988*). La transferencia de multirresistencia mediada por ADN está asociada con la transferencia y sobreexpresión de secuencias de la Gp-P. Esto indica que la sobreexpresión de Gp-P es necesaria para obtener multirresistencia (*Bradley et al., 1988*).

Se han obtenido transformantes multirresistentes al transfectar células sensibles LTA de ratón, con ADN procedente de la línea celular CH^RC5 de ovario de hámster chino. Las células sensibles expresan el gen *pgp* de hámster. De forma similar la transfección de todo

el ADN extraído de células humanas multirresistentes también confiere resistencia a las células de ratón (*Moscow y Cowan, 1988*).

Se ha usado ADN genómico de una sublínea MDR de carcinoma humano KB para transferir el fenotipo MDR a células de ratón NIH 3T3. Los transfectantes primarios y secundarios, seleccionados con colchicina, expresan el gen humano MDR1 (pero no el MDR2). Este gen humano se expresa y amplifica en las líneas celulares transfectadas (*Shen et al., 1986*).

En la segunda parte de estos estudios se ha usado un ADNc con la secuencia completa del gen MDR1, insertada en un vector de expresión. La transfección con el ADNc del gen MDR1, de ratón o humano, permite el aislamiento de transfectantes resistentes a múltiples drogas, tras la selección con drogas citotóxicas. Por el contrario, no se han podido aislar colonias resistentes MDR de células transfectadas o no con plásmidos que no expresan MDR1. La transfección con el gen MDR2 no confiere resistencia a las drogas asociadas con el fenotipo MDR (*Roninson, 1992; Schinkel et al., 1991*).

Mediante la técnica de southern blot se ha demostrado la presencia de secuencias amplificadas de la Gp-P de hámster, sobre un fondo de secuencias endógenas de Gp-P de ratón no amplificado. Los estudios de ADN transfectante, realizados mediante sondas específicas para varios genes de la familia génica de Gp-P indican que las secuencias de Gp-P de hámster transfectadas corresponden al gen *pgp1*. La sobreexpresión de un sólo miembro de la familia multigénica de la Gp-P resulta en el fenotipo completo de resistencia cruzada a múltiples drogas y sensibilidad colateral a agentes activos de membrana (*Bradley et al., 1988*). La prueba definitiva se ha producido por la transfección de los genes de la Gp-P aislados procedentes de células de ratón y humanos; confirmando así resistencia a células sensibles (*Masters, 1990*). La familia génica de Gp-P está estrechamente ligada a otros cinco genes en el genoma de la línea CH^RC5. Se ha visto que los cinco genes flanqueantes no se cotransfectan conjuntamente con el gen de la Gp-P (*Bradley et al., 1988*).

El aislamiento de una sonda de ADNc de ratón de longitud completa, que codifica para la Gp-P, y la transfección de este ADNc mediante un vector de expresión, en células sensibles a drogas, demuestra directamente que la sobreexpresión de un solo gen de Gp-P es suficiente para producir el fenotipo MDR.

El gen humano MDR1 es el homólogo del *pgp1* de hámster. La transfección y sobreexpresión de *pgp1* o *pgp2* puede conferir el fenotipo de multirresistencia en células sensibles a drogas. La transfección de un solo miembro de la familia génica es suficiente para obtener el fenotipo MDR (*Bradley et al., 1988*).

I.5.6.- Expresión del gen MDR1 y su ARNm en tejidos humanos normales y muestras tumorales.

Del estudio y conocimiento del fenotipo MDR en tumores podría deducirse una respuesta para el control quimioterapéutico del cáncer. En esta misma línea es importante conocer la función e importancia de la expresión de la Gp-P en los tejidos normales (*Biedler, 1992*).

Los estudios sobre la distribución y expresión de Gp-P y MDR en los tejidos se han realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas e hibridación de ARNm *in situ*. La tecnología ha desarrollado anticuerpos monoclonales específicos que permiten distinguir entre iso-moléculas de Gp-P. El anticuerpo monoclonal más extendido es el C219 que reconoce una secuencia de aminoácidos altamente conservada en todas las iso-proteínas de Gp-P. De forma similar, se usan el anticuerpo monoclonal MRK16 (*Niehans et al., 1992*), que reconoce una región externa de la molécula y el anticuerpo monoclonal JSB1, que reconoce a un epítipo localizado en la parte citoplasmática de la Gp-P (*Weinstein et al., 1990*).

Tejidos humanos normales.

Los estudios realizados sobre la distribución de Gp-P y el gen MDR1 en tejidos normales, han descubierto altos niveles de expresión en diversos tejidos epiteliales especializados con función secretora o excretora (*Fojo et al., 1987*), de los canalículos biliares del hígado, los túbulos renales proximales, colon, intestino delgado, páncreas, bronquios, próstata, glándulas salivares, cortex adrenal y mama (tabla I.8) (*Cordon-Cardo et al., 1990*). Además, la Gp-P se expresa en grandes niveles en macrófagos, células madre de la médula ósea y células endoteliales de los capilares sanguíneos del cerebro, testículos (*Harris y Hochhauser, 1992*) y placenta (*Lum et al., 1993*).

El papel de la Gp-P en estos tejidos incluye el transporte y excreción de carcinógenos, xenobióticos, hormonas, esteroides, bilirrubina y otras sustancias (*Niehans et al., 1992; Roninson, 1992*). La expresión de Gp-P en el cerebro, médula espinal, testículo, túbulo renal proximal, células madre hematopoyéticas, glándula adrenal y placenta, sugiere un papel de la Gp-P en el transporte hacia el exterior celular de toxinas como mecanismo protector de estos órganos (*Van der Valk, 1990; Chandhary y Roninson, 1991; Hegmann et al., 1992*).

Tabla I.8.- Grado de expresión del gen MDR1 en tejidos normales.

| ALTO | MODERADO | BAJO |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Cortex adrenal | Médula adrenal | Piel |
| Riñón ⁽²⁾ | Tráquea | Músculo esquelético |
| Hígado ⁽³⁾ | Pulmón (bronquios mayores) | Corazón |
| Placenta | | Bazo |
| Colon | Próstata | Esófago |
| Intestino delgado | Glándulas sudoríparas | Estómago |
| Cerebro ⁽⁴⁾ | | Cérvix |
| Testículo ⁽⁴⁾ | | Ovario |
| Páncreas ⁽⁵⁾ | | Médula espinal |
| Macrófagos ⁽⁶⁾ | | Utero |
| | | Médula ósea ⁽¹⁾ |
| | | Tiroides |

Obtenido de Lum *et al.*, (1993); Biedler, (1992); Niehans *et al.*, (1992); Fojo *et al.*, (1987); Harris y Hochhauser, (1992).

(1) Las células de la médula ósea son negativas para la expresión de MDR1, sin embargo, las células madre de la médula ósea (células Stem) son moderadamente positivas.

(2) Túbulo renal proximal

(3) Canalículos biliares

(4) Células endoteliales

(5) Células epiteliales

(6) Efusiones malignas

En los estudios realizados sobre diferentes tejidos se ha podido comprobar que existen diferencias significativas en la expresión del ARNm de la Gp-P. Se han obtenido los valores más altos en riñón y glándula adrenal, niveles intermedios en pulmón, hígado, colon y recto y valores bajos en otros tejidos estudiados (*Bradley et al.*, 1988).

En hámster los niveles más altos de ARNm de la Gp-P se han encontrado en esófago, testículo y útero, mientras que glándula adrenal, riñón e hígado muestran niveles bajos. Esto demuestra que pueden existir diferencias sustanciales entre especies (*Bradley et al.*, 1988).

Tumores humanos.

Se han encontrado niveles elevados de ARNm MDR1 en muestras de tumores de gran variedad de tipos histológicos, siendo los valores observados similares a los de la línea celular de carcinoma KB multirresistente. Algunos de estos tumores habían sido tratados previamente con combinación de quimioterapia (*Bradley et al., 1988*).

En los tejidos tumorales la expresión de Gp-P puede estar correlacionada positivamente con una enfermedad resistente clínicamente avanzada. En tumores procedentes de tejidos que normalmente expresan Gp-P, la expresión es usualmente elevada y tales tumores tienden a ser intrínsecamente resistentes a las drogas (*Ma et al., 1987; Cordon-Cardo et al., 1990*). Los tumores derivados de tejidos en los que no se detecta Gp-P, inicialmente no muestran expresión de Gp-P, pero pueden expresar niveles elevados tras la exposición a la quimioterapia (*Biedler, 1992; Roninson, 1992*).

Existe otra evidencia que sugiere que la expresión del gen MDR1 en algunos tipos tumorales puede estar asociada con transformaciones neoplásicas y progresión tumoral. De este modo, se ha detectado una expresión incrementada del gen en hígado de rata regenerado y en hepatocarcinogénesis inducida químicamente, así como en hepatocitos transformados por oncogenes (*Thorgeirsson et al., 1987; Burt et al., 1988*). En tumores sólidos humanos, la expresión de MDR1 es a menudo, heterogénea y en algunos tipos tumorales está asociada preferentemente con áreas de crecimiento invasivo aparente. En carcinomas de colon no tratados, la presencia de Gp-P en el margen invasivo del tumor presenta correlación significativa con la invasión de vasos pequeños y metástasis en los nodos linfáticos, sugiriendo que la Gp-P es un marcador de las subpoblaciones de células tumorales más malignas. Por el contrario, la expresión de MDR1 en tumores no tratados podría ser reflejo de diferenciación y progresión maligna (*Weinstein et al., 1991*).

El estado de expresión del gen MDR1 puede ser un parámetro clínico útil, para evaluar el papel de la Gp-P en la quimiorresistencia (*Biedler, 1992*) y como test diagnóstico para la predicción de la respuesta del tumor a las drogas quimioterapéuticas (*Roninson,*

1992). Recientemente, se ha visto que existe correlación entre la expresión de MDR1 en tumores individuales y la respuesta de pacientes a la quimioterapia. La incidencia de tumores que no expresan niveles detectables de ARNm MDR1 parece estar correlacionada con la frecuencia de respuesta inicial a la quimioterapia para diferentes tipos tumorales. De este modo osteosarcomas o carcinomas de pulmón de células no pequeñas presentan una baja incidencia (10-20 %) de tumores negativos a MDR1 y leucemias agudas no linfocíticas muestran aproximadamente una incidencia del 50 % de muestras negativas frente a MDR1 (Noonan *et al.*, 1990). Los tumores de mama y ovario presentan niveles más bajos de MDR1 y menor frecuencia de expresión que colon y carcinoma de células renales. Para determinar si los bajos niveles de expresión de ARNm MDR1, detectables por PCR, son predictivos de resistencia a la quimioterapia en tumores individuales, Roninson (Roninson, 1992) ha analizado la correlación entre los niveles de ARNm MDR1 y la respuesta a la quimioterapia en más de 100 pacientes con carcinoma de ovario y pulmón. 56 de ellos fueron tratados con varios regímenes quimioterapéuticos y posteriormente evaluó la respuesta al tratamiento. Los resultados muestran una correlación altamente significativa entre la ausencia de expresión de MDR1 y la subsecuente respuesta a la quimioterapia (Harris y Hochhauser, 1992). No hubo correlación en la respuesta cuando los niveles más bajos detectados de ARNm MDR1 los consideró como negativos. Los niveles muy bajos de expresión de MDR1, correlacionados con la resistencia a la quimioterapia, representan expresión del gen MDR1 en una pequeña subpoblación celular del tumor (Roninson, 1992).

I.6.- ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEÍNA-P.

La Gp-P ha sido caracterizada bioquímicamente como una glicoproteína de membrana plasmática que se extiende en la bicapa lipídica. La porción de Gp-P expuesta en la superficie celular es reactiva con la técnica de unión de carbohidratos de superficie y es además susceptible a la digestión proteolítica. El mapeo de los epítomos con anticuerpos monoclonales ha permitido localizar el extremo C-terminal de la molécula en la parte citoplasmática de la membrana (Bradley *et al.*, 1988).

I.6.1.- Análisis de la secuencia de la glicoproteína-P.

El análisis de la secuencia de ADNc procedente de líneas celulares de ratón, hámster y humanos, que codifican para el gen de la Gp-P ha permitido conocer la secuencia completa de aminoácidos de la molécula. La secuencia de ratón presenta 1276 aminoácidos mientras que la humana contiene 1280 (*Kirschner et al., 1992; Harris y Hochhauser, 1992; Lum et al., 1993; Roninson, 1992; Biedler, 1992*). Se les calcula una masa molecular de 140 y 141 kDa, respectivamente. Estos valores coinciden con el tamaño estimado de 140 kDa para la porción polipeptídica de la Gp-P (*Gros et al., 1986*). Se ha detectado en líneas celulares de macrófagos de ratón la presencia de dos moléculas precursoras de Gp-P diferentes; una de 120 kDa y otra de 125 kDa. El precursor de 120 kDa se convierte en una proteína madura de 130 kDa, mientras que el precursor de 125 kDa madura en proteína entre 135-140 kDa, observándose variaciones en tamaño de una línea celular a otra. Estudios posteriores han identificado la existencia de dos moléculas de Gp-P diferentes, que se producen en líneas celulares MDR diferentes. Las diferencias funcionales de estas dos isoproteínas de Gp-P estriban en la mayor eficiencia que presenta la proteína producida a partir de la molécula precursora de 120 kDa; ya que células que expresan este precursor son casi cuatro veces más resistentes. Se ha podido comprobar que las dos isoproteínas de Gp-P encontradas en células MDR corresponden a los productos génicos de los genes *mdr1a* y *mdr1b*, los cuales son funcionalmente diferentes (*Kirschner et al., 1992*). En el hombre, la proteína precursora de 140 kDa se convierte gradualmente en 170 kDa en un período entre 2 y 4 horas (*Harris y Hochhauser, 1992*). En cada caso, la molécula de Gp-P consiste en dos mitades homólogas (dímero) (*Bradley et al., 1988; Kaye, 1988; Lum et al., 1993*), unidas entre sí (*Biedler, 1992*). La porción duplicada contiene el extremo N-terminal y el C-terminal. La porción C-terminal (hidrofílica) de cada mitad de la molécula es altamente homóloga y cada una contiene la secuencia consenso de un punto de unión e hidrólisis del ATP (*Masters, 1990*). La porción N-terminal presenta menos homología en la secuencia de aminoácidos. Cada mitad de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales (*Azzaria et al., 1989; Harris y Hochhauser, 1992*) unidos (*Roninson, 1992*), dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal que contiene la secuencia consenso de unión e hidrólisis del ATP (*Biedler, 1992; Harris y Hochhauser, 1992; Gros et al., 1986*). La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal (fig. I.9) (*Bradley et al., 1988*). Los segmentos transmembranales en la membrana plasmática están orientados de forma que el extremo C-terminal se sitúe en el lado

citoplásmico de la membrana. Los tres pares de segmentos transmembranales están separados por largas cadenas de aminoácidos en la cara citoplásmica de la membrana y cortas cadenas en la superficie celular (*Bradley et al., 1988*).

Además, la molécula presenta una cadena externa de carbohidratos, situada sobre la cadena exterior de aminoácidos que une los dos primeros segmentos transmembranales, cerca del extremo N-terminal de la molécula (fig. I.9) (*Biedler, 1992*). Al menos 20 kDa de los 170-180 kDa de la proteína son debidos a los carbohidratos. Existen fuertes evidencias para asegurar que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte de drogas o reconocimiento. La fosforilación de la molécula contribuye también a la masa molecular de la Gp-P (*Beck y Cirtain, 1982*).

El estudio de las secuencias de Gp-P muestran una estructura altamente conservada en la porción transmembranal N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplásmicos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de drogas al exterior celular (fig. I.9) (*Biedler, 1992; Masters, 1990*).

Existe un marcado grado de conservación en la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal no sólo entre moléculas de Gp-P de diferentes especies de mamíferos sino también entre la Gp-P y la proteína bacteriana hlyB. Los estudios realizados sobre la importancia funcional de esta sección, altamente conservada, han mostrado la existencia de una gran homología con proteínas de transporte bacterianas que unen al ATP, tales como: his-P, malK, oppD, pstB, rbsA (*Gros et al., 1986*). Todas estas proteínas constituyen sistemas de transporte de sustrato de alta afinidad compuestos de una proteína periplásmica de unión al sustrato, dos proteínas de membrana hidrofóbicas y la proteína de unión al ATP (*Bradley et al., 1988*).

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la Gp-P y las proteínas de transporte bacterianas muestra claramente que la porción C-terminal de cada mitad de la molécula de Gp-P contiene una unidad funcional de unión al ATP.

El grado de homología entre la Gp-P de mamífero y las proteínas de transporte bacterianas es comparable al grado de homología entre las proteínas de transporte bacterianas entre sí (*Bradley et al., 1988*).

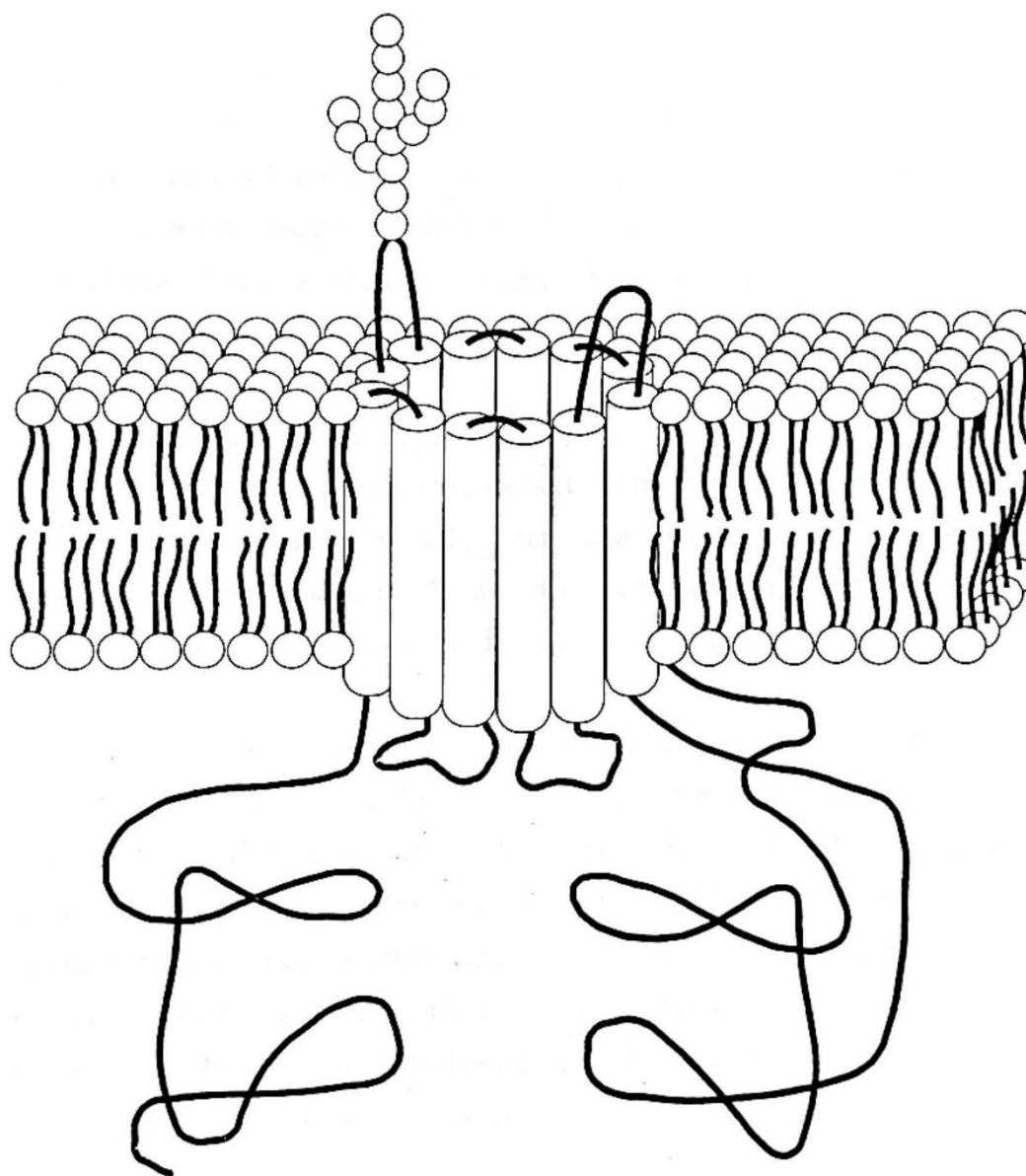


Figura I.9.- Estructura tridimensional de la glicoproteína-P.

Esta proteína actúa como una bomba extrusora de droga. El eflujo, que es dependiente de energía, se realiza a través de un canal que forma en la membrana plasmática. Doce dominios alfa-helicoidales transmembranales forman un poro. El dominio de unión al ATP ha sido localizado en la parte citoplasmática. Las cadenas de glucosacáridos se sitúan en un pequeño péptido extracelular localizado en el extremo N-terminal de la proteína, entre el 1º y 2º dominio transmembranal. Las drogas que entran en la célula son exportadas a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras que pueden ser un péptido o una proteína (Bradley *et al.*, 1988; Biedler, 1992).

I.6.2.- Mutaciones de la glicoproteína-P en la especificidad por el sustrato.

En estudios realizados sobre células de carcinoma humano KB, resistentes a colchicina, se ha visto que la resistencia a la droga de selección está acompañada por una disminución de la resistencia a vinblastina, y que simultáneamente se producen mutaciones puntuales en el gen MDR1; las cuales conducen a la sustitución de la Gly-185 por Val-185 en la secuencia de aminoácidos de la Gp-P (*Choi et al., 1988; Harris y Hochhauser, 1992*).

Esta mutación se ve amplificada al producirse la amplificación del gen MDR1, siendo la responsable de alteraciones en los patrones de resistencia cruzada. Los transfectantes que expresan esta Gp-P mutante presentan un fuerte incremento en su resistencia a colchicina y etopósido así como una disminución en su resistencia a los alcaloides de la vinca y actinomicina D (*Roninson, 1992; Safa et al., 1990*).

El aminoácido 185 se encuentra localizado en la primera región hidrofóbica, del lado citoplásmico, de la Gp-P y está estrechamente relacionado con las interacciones entre las drogas y la Gp-P (*Harris y Hochhauser, 1992*). La sustitución del aminoácido en esta posición podría cambiar la especificidad de la glicoproteína en el transporte de drogas, provocando una alteración en la unión con la droga o en la eliminación de la droga al exterior celular (*Roninson, 1992*). Esta mutación altera más la eficiencia en la disociación de la droga de la Gp-P y su eliminación de la célula, que la unión inicial a la droga (*Roninson, 1992*).

Sin embargo, en un estudio reciente sobre líneas KB transfectadas con ADNc se ha observado que la Gp-P mutante conduce a las células a un incremento en la resistencia al etopósido (VP16) así como a vincristina, actinomicina D y taxol. La reversión de esta resistencia se ha alcanzado con verapamil 1 μ M (*Safa et al., 1990*). Investigaciones posteriores, realizadas con análogos de drogas fotoactivos, han mostrado que la línea celular mutante une menos colchicina y más vinblastina que la cepa silvestre. Esto sugiere que la alteración de la resistencia podría no ser debida a una asociación inicial de la droga con la Gp-P, pero sí a una disociación de ambas (*Harris y Hochhauser, 1992*).

I.6.3.- Homología de la glicoproteína-P con otros sistemas de transporte.

La glicoproteína-P comparte una gran homología con varios transportadores bacterianos, principalmente en la conservación del dominio de unión e hidrólisis del ATP (*Juranka et al., 1989*), los cuales están involucrados en la incorporación de pequeñas moléculas, tales como iones, aminoácidos, péptidos y azúcares (tabla I.9) (*Biedler, 1992*; *Gros et al., 1986*).

Tabla I.9.- Proteínas homólogas u análogas a la glicoproteína-P.

| TRANSPORTADOR | ORGANISMO | SUSTRATO |
|----------------|------------------------|----------------------|
| MDR1 | Humano | Drogas MDR; ? |
| MalK | <i>E. coli</i> | Maltosa |
| OppD,F | <i>S. typhimurium</i> | Oligopéptidos |
| HlyB | <i>E. coli</i> | α -hemolisina |
| ArsA,B,C | <i>Bacteria</i> | Arsenato |
| White, Brown | <i>D. melanogaster</i> | Pigmentos |
| STE6 | <i>S. cerevisiae</i> | Factor-a |
| pfMDR | <i>P. falciparum</i> | ? |
| CFTR | Humano | ? |
| Adenil-ciclase | Bovino | AMPc (?) |

Obtenido de Biedler, (1992).

La gran homología entre cada mitad de la molécula de Gp-P y la proteína de membrana bacteriana HlyB (*Lum et al., 1993*), transportadora de α -hemolisina (*Harris y Hochhauser, 1992*), sugiere que el gen de la Gp-P pueda haberse originado por la duplicación en tandem de un gen ancestral como el HlyB (*Roninson, 1992*). El extremo C-terminal de esta proteína contiene el dominio de unión al ATP, el cual es idéntico al de la Gp-P en el 50 % de sus aminoácidos (*Harris y Hochhauser, 1992*). Una de las proteínas de transporte bacterianas, RbsA, la cual comparte homología con HlyB y Gp-P en el dominio de unión al ATP, también consiste en una molécula duplicada en tandem. El gen ancestral de Gp-P puede haber evolucionado en una familia multigénica a través de duplicaciones adicionales del gen.

El análisis de la secuencia de la mitad 3' de genes de Gp-P de hámster (pgp1, 2 y 3) revela que la organización intrón-exón se conserva entre los miembros de la familia génica, indicando que ya estaba establecida antes del desarrollo de la familia génica. La estructura de la familia génica parece estar conservada entre especies, aunque el patrón de expresión de los genes de Gp-P varía entre diferentes células y tejidos (*Bradley et al., 1988*).

Aunque se han descubierto más de 30 proteínas de unión al ATP con estructura y/o función similar a la Gp-P, sólo algunas de ellas están presentes en células eucariotas. Así, el producto del gen STE6 de *Saccharomyces cerevisiae* es el exportador de la feromona factor-a (MAT) (*McGrath y Varshavsky, 1989*); y el gen pfmdr1 se encuentra implicado en la resistencia a cloroquina de *Plasmodium falciparum* (*Harris y Hochhauser, 1992; Foote et al., 1989*). El producto génico, CFTR, de la fibrosis cística es un miembro de la superfamilia de transportadores de proteínas procariotas y eucariotas. La adenil-ciclasa es un buen ejemplo de proteína análoga, con una pequeña secuencia idéntica a la Gp-P pero de topología considerablemente similar. Parece ser que esta proteína puede actuar exportando de la célula el AMPc sintetizado (*Krupinski et al., 1989*).

La homología encontrada entre todos estos sistemas de transporte y la Gp-P estriba en la identidad de la secuencia de aminoácidos y la similitud funcional; particularmente la relacionada con el papel de la hidrólisis del ATP para la producción de energía en los procesos de transporte de membrana (*Biedler, 1992*).

I.7.- MODELO DE FUNCIONAMIENTO DE LA GLICOPROTEINA-P.

La información obtenida del análisis de la secuencia de aminoácidos de la Gp-P de células de ratón, humanas y hámster ha dado como resultado un modelo estructural de esta proteína de membrana (fig. I.9).

La Gp-P forma un canal en la membrana plasmática y transporta drogas fuera de la célula usando la energía derivada de la hidrólisis del ATP (fig. I.10) (*Slovak et al., 1991; Juranka et al., 1989*). Cada mitad de la molécula no actúa independientemente en el transporte de drogas, ya que la inactivación de uno o dos puntos de unión e hidrólisis del ATP conlleva a la pérdida de la actividad de esta proteína (*Biedler, 1992*).

En una versión de este modelo las drogas se unen a la Gp-P directamente y después son eliminadas de la célula. En este punto hay que hacer dos consideraciones:

- La unión de la droga a la Gp-P debe ser reversible ya que las moléculas de droga tienen que ser eliminadas de la superficie celular.
- La transfección de ADNc de Gp-P a células sensibles da como resultado resistencia cruzada a drogas no relacionadas estructuralmente; por lo que la molécula de Gp-P debe tener sitios de unión para un diverso grupo de drogas, probablemente en su dominio hidrofóbico.

Existe evidencia experimental para sostener esta versión, ya que se han observado en líneas celulares MDR vesículas de membrana que sobreexpresan una proteína de 150-180 kDa, la cual presenta puntos específicos de unión para vinblastina. Esta unión es inhibida por dos de las drogas con las que presentan resistencia cruzada (vincristina y daunorubicina). Este hecho sugiere que estas drogas pueden competir por el mismo punto de unión o unirse a sitios extremadamente adyacentes (*Bradley et al., 1988*).

La Gp-P también une a otras drogas involucradas en el fenotipo MDR, tales como colchicina y actinomicina D, las cuales no compiten por el punto de unión para vinblastina en las vesículas de membrana (*Biedler, 1992*).

La reversión de la resistencia a múltiples drogas puede ocurrir por la inhibición de la unión de las drogas con la Gp-P. Existen dos evidencias que sugieren que puede haber múltiples dominios de unión a drogas en la Gp-P.

- La inhibición de la unión de análogos de la vinblastina a la Gp-P no está relacionada con la habilidad para revertir la resistencia a varios compuestos tales como trifluoperazina y cloroquina (*Bradley et al., 1988*).
- Drogas como colchicina y actinomicina D, que están involucradas en el fenotipo MDR no compiten por el sitio de unión a vinblastina en las vesículas de membrana de células multirresistentes (*Biedler, 1992*).

En la segunda versión del modelo de funcionamiento, una proteína de unión a la droga es transportada fuera de las células por la Gp-P, que actúa como una bomba (*Sonneveld et al., 1992; Lum et al., 1993*), de forma similar a la exportación de α -hemolisina por HlyB de *E. coli* (*Biedler, 1992; Roninson, 1992*). Las drogas se unen irreversiblemente a esta proteína y el complejo droga-proteína es eliminado de la célula. Esta proteína de unión puede ser un componente celular expresado normalmente, pero debe ser producido en cantidades suficientes ya que se exporta continuamente (*Bradley et al., 1988*).

La Gp-P ha sido purificada a partir de extractos de membrana y se ha observado que presenta actividad ATPasa. Esto permite determinar si la hidrólisis del ATP por la Gp-P está emparejada al eflujo de droga, tal como predice este modelo.

La exagerada presencia de una molécula compleja como la Gp-P en la membrana plasmática de células MDR produce múltiples efectos sobre la estructura y función de la

misma, incluyendo permeabilidad de la membrana y respuesta a agentes activos de membrana tales como ionóforos, anestésicos locales y detergentes no-iónicos.

La resistencia a colchicina en células MDR muestra características que indican la existencia de una barrera de permeabilidad dependiente de energía. La colchicina se une con gran afinidad a su objetivo intracelular, la tubulina, y parece ser que un mecanismo de eflujo de drogas puede competir con la tubulina por la colchicina intracelular (*Bradley et al., 1988*).

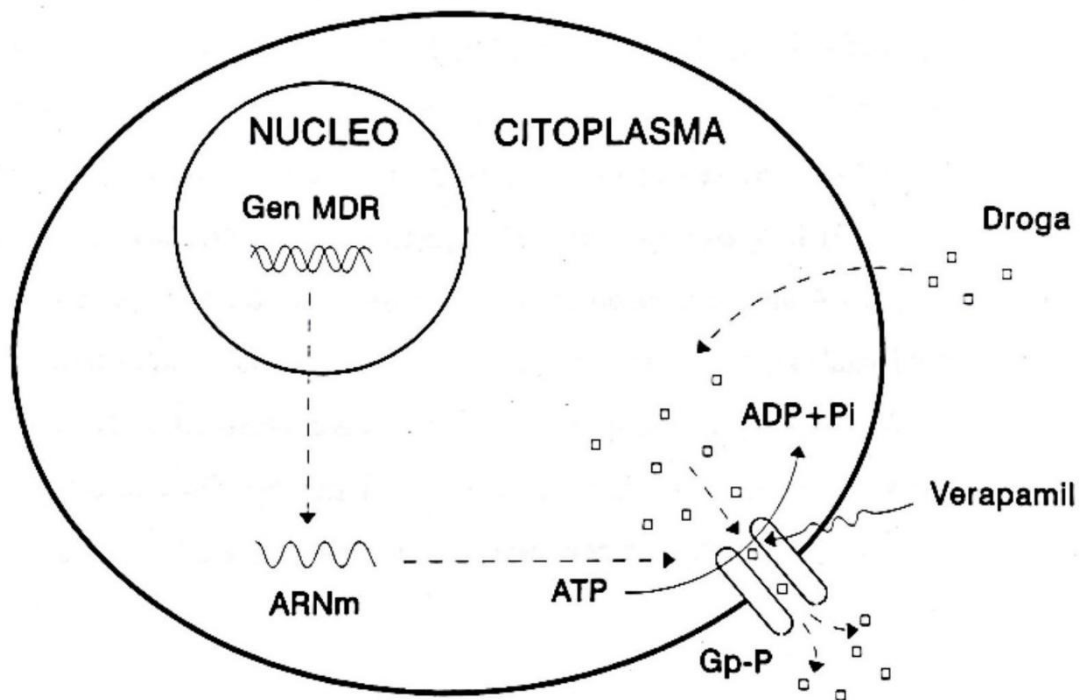


Figura I.10.- Modelo de funcionamiento de la resistencia mediada por glicoproteína-P.

La glicoproteína-P sintetizada se coloca en la membrana plasmática. Las drogas que entran en la célula son expulsadas al exterior a través del poro que forma esta proteína. El proceso se realiza mediante la energía liberada de la hidrólisis del ATP. Las moléculas como el verapamil son capaces de inhibir este eflujo, provocando una acumulación intracelular de droga.

I.7.1.- Regulación de la glicoproteína-P por la proteína quinasa C.

Varias modificaciones post-translacionales de la molécula de Gp-P tales como glucosilación y fosforilación podrían ser consideradas como posibles mecanismos de modulación de su función; ya que contiene un gran componente de carbohidratos que supone aproximadamente el 20 % de su masa molecular relativa y además la Gp-P puede ser fosforilada *in vivo* e *in vitro* (Hamada et al., 1987). Las células mutantes MDR deficientes en glucosilación no presentan cambios en los patrones de resistencia cuando se comparan con las células parentales (Harris y Hochhauser, 1992).

Parece ser razonable que las diferencias de fosforilación puedan jugar un papel importante en la alteración del fenotipo MDR. En consecuencia, se ha visto en células resistentes una alteración en las actividades enzimáticas de varias quinasas y/o fosfatasa (Meyers, 1989). La Gp-P es fosforilada en la porción basal por la proteína quinasa C (PKC), lo que afecta al transporte de drogas. Esta fosforilación se incrementa 2 veces mediante el tratamiento con ésteres de forbol, en algunas líneas celulares de carcinoma. Sin embargo, la estaurosporina y el H7, inhibidores de la PKC y de la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc, no afectan a la tasa de fosforilación de la Gp-P. En estudios realizados sobre células HL60 resistentes a vincristina se ha demostrado que existe otra proteína quinasa (PK1) asociada a la membrana, la cual también fosforila a la Gp-P en residuos de serina y treonina, pudiéndose regular así los niveles de resistencia a múltiples drogas (Chambers et al., 1990; Staats et al., 1990).

La actividad de la Gp-P puede ser regulada por los agentes quimioterapéuticos. Este modelo (fig. I.11) predice que la exposición de las células a las sustancias anfipáticas, tales como antraciclinas, activa la fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacil-glicerol (DAG). El aumento de los niveles de DAG en la membrana da como resultado la traslocación de la PKC a la membrana plasmática, donde fosforila a la Gp-P. La fosforilación de la Gp-P aumenta la actividad extrusora y conduce a la eliminación de la droga de la membrana, con lo cual vuelve la actividad de la PLC a su estado basal. Tras el metabolismo de DAG, la Gp-

P es desfosforilada gracias a la acción de fosfatasas específicas de serina/treonina, las cuales hacen que vuelva a su estado basal. La actividad de las fosfatasas podría ser incrementada mediante la liberación de calcio intracelular del retículo endoplásmico por el IP₃ (Hait y Aftab, 1992).

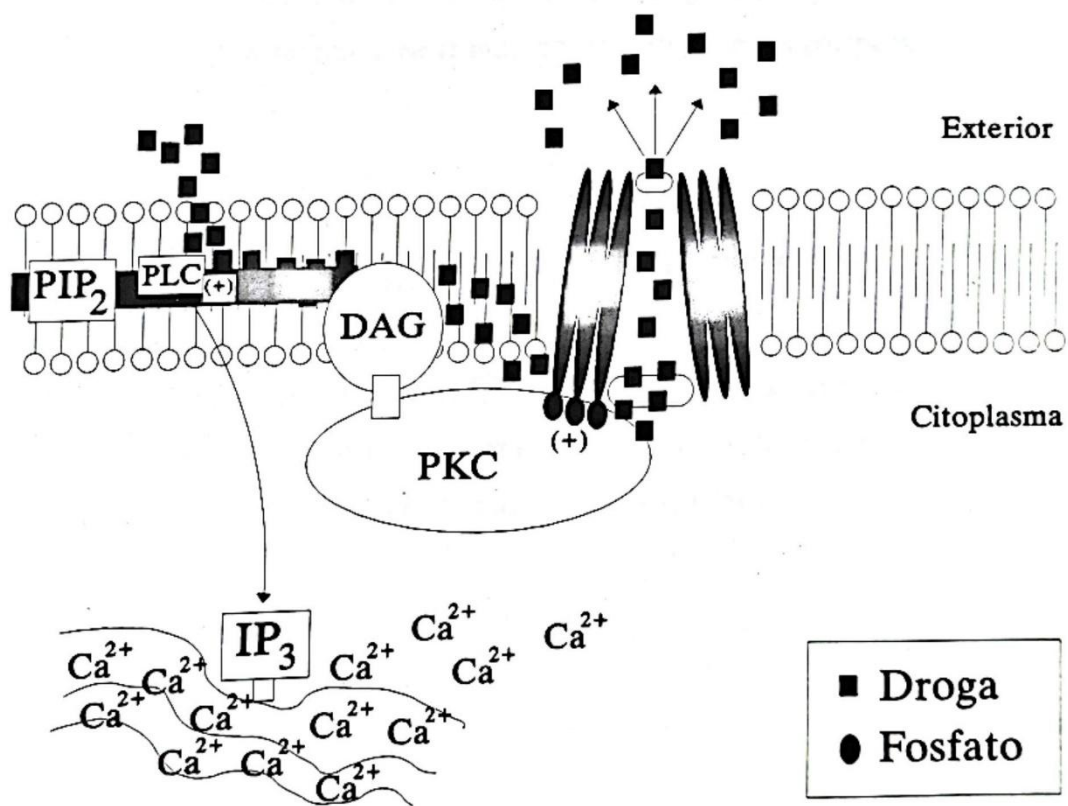


Figura I.11.- Modelo de regulación de la actividad de la glicoproteína-P por la proteína quinasa C. La fosfolipasa C (PLC) es activada por las drogas antitumorales para catalizar la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacil-glicerol (DAG). La producción de DAG conduce a la translocación de la proteína quinasa C (PKC) a la membrana celular donde fosforila a la Gp-P aumentando su actividad. La extrusión de droga de la célula inactiva la PLC y el DAG es metabolizado. Posteriormente, la Gp-P es defosforilada por la acción de fosfatasas serina/treonina, las cuales fueron activadas por el calcio liberado del retículo endoplásmico por el IP₃. Obtenido de Hait y Aftab, (1992).

En consonancia con esta alteración, los grupos fosfato de la Gp-P son metabólicamente activos y la proteína sufre ciclos rápidos de fosforilación y desfosforilación; lo que sugiere que este hecho juega un papel importante en la actividad biológica de esta molécula de transporte (*Ma et al., 1991*).

Las alteraciones del estado de fosforilación de la Gp-P parecen estar involucradas en los mecanismos de acción de varios compuestos que aumentan la acumulación de droga en células MDR, resultando en una reversión de la resistencia a drogas. Así, el verapamil y la trifluoperazina, entre otras, revierten parcialmente la multirresistencia. Cambios en la fosforilación de proteínas parecen estar también involucrados en la reversión de la multirresistencia por estos compuestos (*Bradley et al., 1988*).

I.8.- RESISTENCIA MEDIADA POR GLUTATIÓN.

El glutatión (GSH) y otros compuestos relacionados con su metabolismo (fig. I.12) así como metalotioneínas (*Perez et al., 1993*) detoxifican la célula frente a una amplia variedad de sustancias químicas, incluyendo las drogas quimioterapéuticas (*Masters, 1990; Ozols, 1992*).

Estas moléculas se unen a las drogas en el citoplasma o núcleo, evitando su interacción con el ADN o bien se unen a agentes alquilantes o *cis*-platino que ya han interactuado con él, previniendo así entrecruzamientos en el ADN (*Batist et al., 1986*).

Las alteraciones provocadas en la concentración o tasa de reacción de alguno de los componentes de su ruta metabólica puede influir en la respuesta a la droga (*Arrick y Nathan, 1984*).

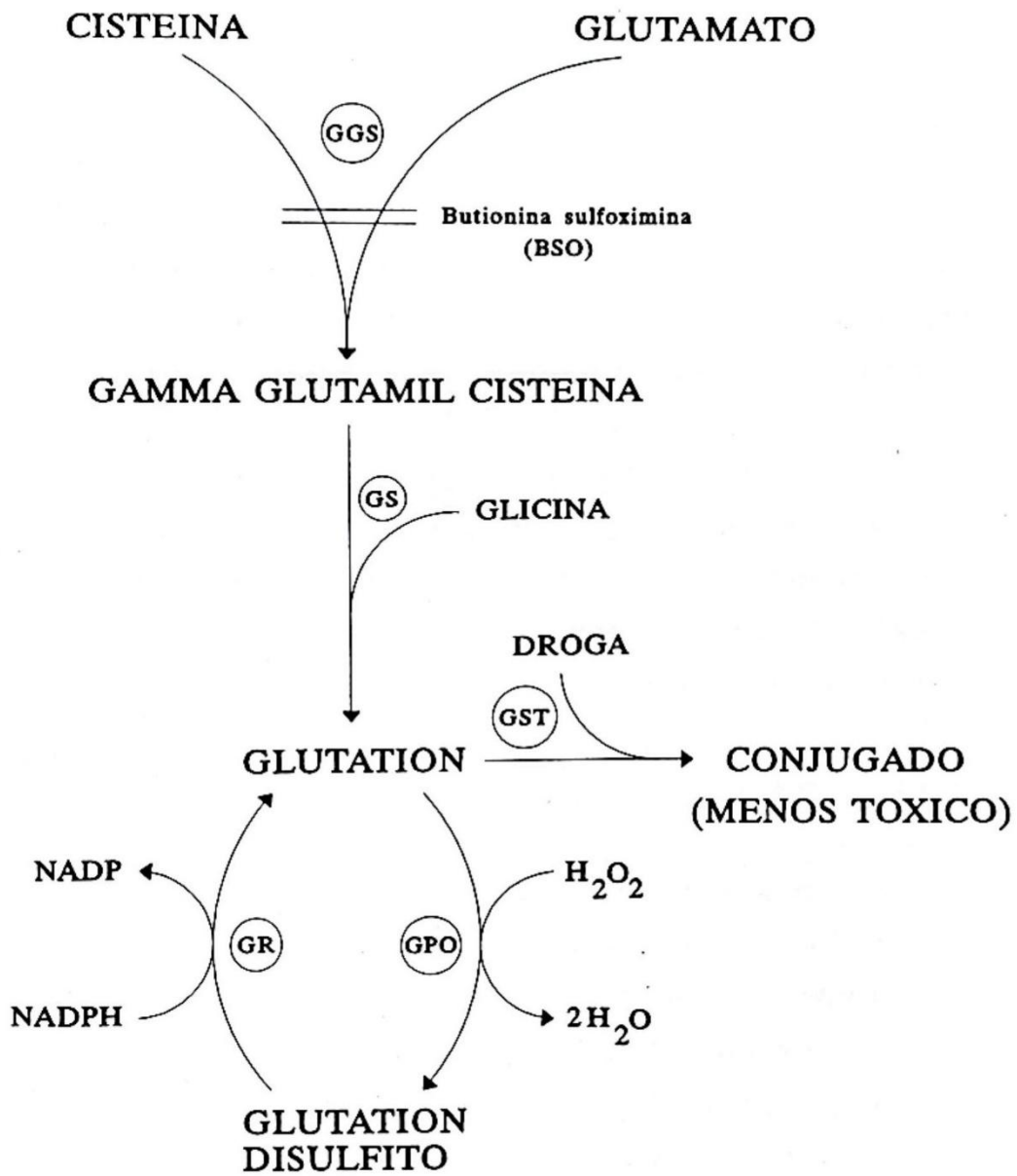


Figura I.12.- Ruta metabólica del glutatión.

GGS: Gamma glutamil cisteína sintetasa. GS: Glutatión sintetasa. GST: Glutatión-S-transferasa. GPO: Glutatión peroxidasa. GR: Glutatión reductasa.

Obtenido de Masters, (1990).

La síntesis de GSH la catalizan dos enzimas, gamma glutamil cisteína sintetasa (GGS) y glutatión sintetasa (GS). Un aumento de actividad de alguna de estas enzimas puede resultar en un mayor nivel de GSH y consecuentemente en una mayor resistencia a las drogas.

El GSH está presente en varias formas intercambiables. Una vía es el ciclo redox en el cual la oxidación del glutatión a glutatión disulfido la cataliza la enzima glutatión peroxidasa (GPO). La reducción del glutatión disulfido a glutatión la cataliza la enzima glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH (fig. I.12). Un aumento de actividad de este ciclo redox está asociado con la resistencia *in vitro* a drogas.

Por otro lado, las glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas ampliamente distribuidas, aunque principalmente en hígado y riñón (*Harris y Hochhauser 1992*), que participan junto con el GSH en el metabolismo y detoxificación de toxinas ambientales y drogas quimioterapéuticas (*Perez et al., 1993; Ozols, 1992*). La enzima glutatión S-transferasa (GST) conjuga el GSH, a través del átomo de azufre de su residuo de cistina, con drogas quimioterapéuticas. La sobreexpresión de GST en sistemas experimentales también está asociada con resistencia a múltiples drogas (*McGuire, 1992; Harris y Hochhauser 1992*). Las enzimas GSTs puede también actuar como proteínas de unión intracelular (ej. para bilirrubina y esteroides) y pueden constituir hasta el 10 % de las proteínas celulares totales en el hígado. En el hombre, se ha encontrado GST en formas citosólica y microsomal. Existen tres clases principales de GST citosólicas: α , μ , π (*Pickett y Lu, 1989; Morrow y Cowan, 1990*). El ácido etacrínico es un modulador de la actividad GST (*Ozols, 1992*), aunque no es un inhibidor específico. Esta droga aumenta la citotoxicidad de algunos agentes alquilantes *in vitro* y en modelos animales (*Perez et al., 1993*).

El metabolismo del GSH está involucrado en la respuesta a las drogas al menos de cinco formas diferentes (*Johnson et al., 1993*):

- Detoxificación. La formación de conjugados GSH-droga inactivos, pueden ser espontáneos o catalizados.
- Activación. El GSH metaboliza algunas drogas, como neocarzinostatina, a derivados más tóxicos.

- Transporte de drogas. Alteraciones en el transporte mediado por GSH.
- Protección del ADN de la formación de uniones con drogas potencialmente citotóxicas.
- Influencia en la reparación del ADN.

No existe correlación entre los niveles de GSH o las enzimas de su ruta metabólica y la sensibilidad a algunas droga (*Masters, 1990*).

Algunas líneas celulares resistentes *in vitro* presentan niveles elevados de GSH en relación a la línea parental sensible, pero en otras líneas resistentes no se observa alteración alguna. Se ha demostrado que el GSH puede inhibir la formación de *cis*-dicloro(etilendiamino)platino, el cual se une al ADN a concentraciones fisiológicas de GSH, observándose la formación de entrecruzamiento GSH-Pt-deoxiguanosina. Los niveles elevados de GSH están asociados con un aumento de resistencia a *cis*-platino (*McGuire, 1992*) y melfalan en líneas tumorales de ovario y leucemia murina (*Perez et al., 1993; Johnson et al., 1993*). Varias drogas antitumorales pueden ser inactivadas por la actividad GST; ej. melfalan, clorambucil y ciclofosfamida. Existe correlación entre el aumento en isoenzimas GST, principalmente la familia π , con la resistencia a drogas. Puede haber cantidades incrementadas de enzimas involucradas en la síntesis de GSH y GPO. Se ha visto que GST π es importante y constituye la isoenzima predominante en tumores humanos de colon, vejiga, ovario y estómago; con un incremento en los niveles de ARN de 2-4 veces con respecto a los tejidos normales. Se ha visto que se sobreexpresa en varias líneas MDR, principalmente, en líneas resistentes a doxorubicina. Estudios realizados en pacientes con cáncer de ovario muestran expresión de las isoenzimas α y π , tras el tratamiento (*Harris y Hochhauser, 1992*).

La disminución intracelular de GSH por privación nutricional sensibiliza a células de leucemia murina frente a melfalan (*Perez et al., 1993; Harris y Hochhauser, 1992*). Consecuentemente inhibidores de la síntesis de GSH, como la butionina sulfoximina (BSO), que inhibe la actividad GGS, resulta en una disminución de los niveles de GSH, y por consiguiente se ha observado un aumento en la citotoxicidad de compuestos de platino, melfalan (*McGuire, 1992*) e irradiación (*Batist, 1986; Mistry et al., 1991; Ozols, 1992*).

Además, la conjugación por medio de GSTs es importante debido a que son un grupo de enzimas responsables del metabolismo y detoxificación de muchas moléculas endógenas y exógenas (*Johnson et al., 1993*). La transformación con los oncogenes *vH-ras* y *v-raf* induce resistencia a un número de agentes citotóxicos y a la síntesis de Gp-P y GST π , en células NIH 3T3 (*Harris y Hochhauser, 1992*). En cancer de colon, los niveles de GST son mayores que en los tejidos normales que rodean al tumor (*Masters, 1990*).

La transfección de ADNc de GST π en células NIH 3T3 transfectadas con el oncogen *ras*, conduce a alcanzar niveles elevados de enzima GST π ; pero sólo se produce un moderado incremento (1,8-3 veces) de resistencia a doxorubicina y ácido etacrínico (sustrato de GST π) y ningún cambio en la resistencia a *cis*-platino, clorambucil y melfalán. Se ha analizado la línea celular MCF7 de cáncer de mama resistente a doxorubicina con expresión GST π y MDR. Se han clonado y transfectado los ADNc de GST π y MDR, y aunque se ha conferido el fenotipo MDR, sólo se ha obtenido una moderada resistencia al ácido etacrínico mediada por GST π . La transfección de GST π , junto con MDR, no ha mostrado efecto adicional significativo. Podría ser que otras enzimas del metabolismo del GSH sean importantes y la actividad GPO haya sido relativa a resistencia contra doxorubicina (*Lewis et al., 1988*).

I.9.- RESISTENCIA MEDIADA POR TOPOISOMERASAS.

La topoisomerasa II es una enzima esencial para la replicación y transcripción del ADN, así como para la recombinación y segregación cromosómica (*Wang, 1985*). La topoisomerasa II hace posible el acceso al ADN mediante rotura y reparación de la doble cadena (*Masters, 1990*). Es la proteína homóloga a la ADN girasa bacteriana y está constituida por un homodímero de 170 kDa (*Harris y Hochhauser, 1992*). La topoisomerasa I actúa de forma similar sobre el ADN monocatenario.

La enzima actúa produciendo roturas en la cadena de ADN bicatenario, uniéndose covalentemente al extremo 5' de la rotura. Las roturas están sujetas por 4 pares de bases en la cadena opuesta y la proteína se une como un dímero. Posteriormente, se produce el paso de la cadena de ADN por la rotura, con cambios en el superenrollamiento y relajación de la hebra (*Harris y Hochhauser 1992*), (este estado se conoce como complejo hendible). Seguidamente, se produce la liberación parcial de la cadena (*Liu, 1989*).

Las drogas que interaccionan con topoisomerasa II, son adriamicina, daunorubicina, ellipticina, VP16, mAMSA, VM26, actinomicina D y mitoxantrone. Existe un grupo de agentes no intercaladores que se unen directamente a la topoisomerasa II; los más importantes son el tenipósido (VP26) y el etopósido (VP16). Se ha podido comprobar que las topoisomerasas están relacionadas con el fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR) (*Harris y Hochhauser, 1992*).

Las drogas estabilizan el complejo hendible atrapando a la topoisomerasa II sobre el ADN y matando la célula. Cada tipo de droga produce un espectro diferente de complejos hendibles en zonas diferentes del ADN (*Liu, 1989*).

Casi todas las drogas que inhiben la topoisomerasa aumentan el número de enzima asociado a las roturas de la cadena de ADN aunque esto no siempre se correlaciona con la citotoxicidad ya que las drogas pueden tener otros mecanismos de acción. Parece ser que un mecanismo común de acción puede ser la inhibición de la capacidad de la enzima para unir la cadena de ADN cortada (*Robinson y Osheroff, 1990*).

La muerte celular inducida por la droga es proporcional al nivel de topoisomerasa II; mientras más enzima hay mayor es la toxicidad. No es sorprendente que la resistencia en algunos modelos experimentales se deba a unos niveles muy reducidos de topoisomerasa II y/o I (*Masters, 1990; Brian et al., 1993*).

La mayor actividad topoisomerasa II en tejidos normales se ha encontrado en timo y bazo. En tumores los valores más altos se han detectado en cáncer de mama y leiomioma (*Harris y Hochhauser, 1992*).

I.9.1.- Regulación de la topoisomerasa II.

La topoisomerasa II se expresa principalmente durante la fase proliferativa de crecimiento. La cantidad de topoisomerasa II se incrementa al inicio de la replicación del ADN y continúa incrementándose durante las fases S y G₂ hasta alcanzar sus valores máximos al final de G₂-M, para posteriormente disminuir al final de la mitosis (*Harris y Hochhauser, 1992*).

La importancia de la regulación de la topoisomerasa II durante el ciclo celular estriba en conocer cuál es la fase más sensible para los inhibidores de esta enzima. Tras la estimulación de células BALB-c 3T3 con suero, las células activas proliferativamente muestran una mayor sensibilidad al etopósido que las células quiescentes. El incremento en sensibilidad a la droga comienza durante la fase S y alcanza el máximo justo antes de la mitosis. Sin embargo, aunque el nivel máximo de topoisomerasa II asociada a roturas en la cadena de ADN se produce durante G₂, la citotoxicidad es máxima durante la fase S, sugiriendo que las interacciones con otros mecanismos conducen a la muerte celular (*Chow y Ross, 1987*). La modulación de la actividad topoisomerasa II durante el ciclo celular involucra procesos de fosforilación. Esta afirmación se ha demostrado para caseína quinasa y para la proteína quinasa C. Estos cambios pueden ser cruciales en la activación de la actividad topoisomerasa. La fosforilación produce un aumento de 3 veces en la actividad de la enzima y la desfosforilación la inactiva. Se ha visto que los mayores niveles de fosforilación se producen en G₂ y M (*Heck et al., 1989*).

I.9.2.- Topoisomerasa II y resistencia a drogas.

En numerosas líneas celulares se ha observado la existencia de un fenotipo atípico de resistencia a múltiples drogas. Estas células presentan resistencia cruzada a todas las drogas anti topoisomerasa II, excepto a los alcaloides de la vinca (*Harris y Hochhauser, 1992*).

Estos mecanismos pueden incluir:

Mutaciones y topoisomerasas anormales.

Las roturas en el ADN producidas por mAMSA o etopósido tienen un absoluto requerimiento por el ATP, al contrario de lo que sucede en las células de la cepa silvestre. En las células resistentes se ha encontrado un nuevo polimorfismo de enzimas de restricción. Una mutación en el punto de unión al ATP parece ser el responsable de la inducción de resistencia al mAMSA en la topoisomerasa de ADN del bacteriófago T4 (*Huff et al., 1990*). Varios estudios han demostrado la existencia de formas de topoisomerasa II funcionalmente anormales en células resistentes a drogas (*Harris y Hochhauser, 1992*).

Metilación.

Varios estudios han demostrado la existencia de puntos hipermetilados. Esto puede ser de importancia en la regulación de la transcripción de alelos no mutantes (*Tan et al., 1989*).

Deprivación de glucosa e hipoxia.

Estos factores pueden ser relevantes en la masa tumoral y contribuyen hacia una disminución en la expresión de topoisomerasa (*Harris y Hochhauser, 1992*).

Factores citosólicos.

Una variedad de actividades enzimáticas antioxidantes se incrementan en células resistentes, incluyendo glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Estas enzimas pueden inactivar los radicales libres formados por la acción de algunas drogas (Harris y Hochhauser, 1992).

Hiperregulación de topoisomerasa I.

La topoisomerasa I es una enzima, involucrada en la transcripción, que produce roturas en el ADN monocatenario. Esta enzima puede incrementar su actividad como efecto compensatorio con la subregulación de la topoisomerasa II y puede ser capaz de realizar la función de ésta, al menos parcialmente, cuando se encuentra subregulada (Harris y Hochhauser, 1992).

Topoisomerasa II β

Se ha comprobado la existencia, en células de leucemia P388 resistentes a mAMSA, de otra forma de topoisomerasa II de 180 kDa que difiere en varios aspectos a la forma conocida de 170 kDa (topoisomerasa II α). Esta nueva forma enzimática difiere en la expresión a través del ciclo celular y en la sensibilidad a drogas. Los niveles de topoisomerasa II β alcanzan el pico máximo durante G₁ y caen durante el resto del ciclo celular. La topoisomerasa II α se expresa en células de proliferación rápida y su tasa se incrementa al compararla con la topoisomerasa II β , en células transfectadas NIH 3T3 (Chung et al., 1989).

I.10.- RESISTENCIA MEDIADA POR REPARACIÓN DEL ADN.

La capacidad de reparación del ADN es una propiedad fundamental de las células normales que permite reparar los daños provocados por la radiación y los agentes químicos. De la misma manera, las células tumorales pueden protegerse contra los efectos letales de la

radioterapia y la quimioterapia. Uno de los mecanismos de resistencia puede ser una mayor actividad en la reparación del ADN (*Brian et al., 1993*).

La principal evidencia de que la capacidad de reparación del ADN es determinante en la respuesta a la quimioterapia proviene de que células que presentan una capacidad de reparación mermada, son hipersensibles a los agentes antitumorales. Los inhibidores de la reparación del ADN aumentan la citotoxicidad de las drogas en la mayoría de las líneas celulares (*Perez et al., 1993*).

El estudio de la reparación del ADN es complejo debido a que existen múltiples formas por las que éste puede ser dañado: roturas simples o dobles en la cadena, mutaciones puntuales, bases mal emparejadas, entrecruzamiento y deleciones. Cada tipo de daño necesita una estrategia bioquímica diferente, requiriéndose muchas enzimas. El principal mecanismo es la reparación de una rotura o escisión de nucleótidos, el cual necesita cinco pasos diferentes (*Perez et al., 1993*):

- Reconocimiento de la base dañada.
- Corte de la cadena de ADN en el lugar del daño.
- Eliminación de la base dañada o nucleótido completo.
- Reemplazar la base dañada o el nucleótido.
- Ligamiento de los dos extremos de la cadena y restauración de la estructura de la cromatina.

Las enzimas de reparación por escisión son objetivos para la quimioterapia, ya que el aumento en la reparación del ADN es un mecanismo de resistencia significativo (*Perez et al., 1993*). Las glucosilasas y endonucleasas eliminan bases dañadas, las polimerasas rellenan los huecos en la cadena de ADN y las ligasas unen los fragmentos de ADN (*Masters, 1990*). Se han encontrado, en líneas celulares resistentes a drogas, niveles elevados de enzimas que contribuyen a la replicación y reparación del ADN, tales como las ADN polimerasas α y β , timidilato sintetasa, timidina quinasa y dihidrofolato reductasa (*Scanlon, 1989*).

Los efectos citotóxicos provocados por *cis*-platino y agentes alquilantes ocurren por la formación de lesiones en el ADN nuclear. Estas lesiones alteran la síntesis de ADN y la transcripción (*Eastman, 1987*). Al estudiar las lesiones provocadas *in vitro* se ha visto que

se producen uniones intracatenarias localizadas en la posición N7 de residuos de guanina adyacentes (Pt[GG]) o entre una adenina flanqueada por un residuo de guanina (Pt[AG]). Otra lesión que se forma entre dos residuos de guanina, en cadenas de ADN opuestas, es el entrecruzamiento intercatenario (*Johnson et al., 1993*). La capacidad de las células tumorales de reparar rápida y eficientemente el ADN dañado puede ser un mecanismo de resistencia para el *cis*-platino y los agentes alquilantes (*Masuda et al., 1988*).

La inhibición de la reparación del ADN es la estrategia lógica para revertir la resistencia celular mediada por este mecanismo. La afidicolina es un inhibidor de la ADN polimerasa α y β (*Ozols, 1992*), que bloquea la reparación del ADN en las líneas celulares A2780 y 2780-cp 70 de carcinoma de ovario humano, en forma dependiente de dosis (*Perez et al., 1993*).

El GSH puede facilitar la reparación, ya que es cofactor de varias enzimas celulares; incluyendo algunas polimerasas de ADN que pueden participar en este mecanismo (*Ali-Osman, 1989*). Por otro lado, el efecto del BSO sobre la reparación del ADN se revierte completamente por el tratamiento de las células con el monoéster de GSH. Los cambios en los niveles de GSH celular pueden influir en la reparación del ADN y la citotoxicidad de algunas drogas (*Perez et al., 1993*).

La resistencia a las nitrosoureas está asociada con altos niveles de una enzima reparadora de ADN, 0⁶-alquil-guanina-ADN alquiltransferasa (AT). AT influye en la sensibilidad a las cloroetilnitrosoureas tales como CCNU y BCNU. Estos compuestos interactúan con el ADN, en un principio alquilando la posición 0⁶ de una guanina y después se unen a una segunda base formando un entrecruzamiento. La enzima elimina la fracción monofuncional del grupo alquilo, dejando la base intacta, y entonces previene la formación de entrecruzamiento. Los niveles de AT varían entre especies y tejidos. El interés clínico en AT ha aumentado porque aproximadamente el 25 % de las líneas celulares tumorales humanas contienen bajos niveles, sugiriendo que un subgrupo de tumores pueden ser particularmente sensibles a las cloroetil-nitrosoureas. Sin embargo, las biopsias de tumores humanos normalmente contienen AT, a menudo a niveles similares a los tejidos normales. Es posible que AT en estas biopsias derive del tejido normal, más que de las células tumorales, pero parece ser que algunas líneas celulares pierden AT durante su cultivo *in vitro* (*Perez et al., 1993; Harris, 1985*).

Otro objetivo potencial para la quimioterapia del cáncer es la enzima nuclear poli-ADP ribosa polimerasa. Esta enzima retrasa la síntesis de ADN y ARN después de haberse provocado daño en el ADN, permitiéndolo así la reparación antes de que la porción dañada sea replicada. Varios análogos de la nicotinamida, incluyendo 3-aminobenzimidida y 3-acetaminobenzimidida, inhiben la enzima y potencian la citotoxicidad *in vitro* de algunas drogas bajo determinadas condiciones (Harris, 1985).

Algunas líneas celulares pueden vivir a pesar de presentar niveles detectables de ADN dañado. Esto indica que no todas las lesiones en el ADN producidas por agentes alquilantes y *cis*-platino son necesariamente letales. La capacidad para tolerar el daño producido en el ADN constituye un importante mecanismo de resistencia (Perez *et al.*, 1993; Eastman y Sculte, 1988).

I.11.- PLANTEAMIENTOS PARA EL FUTURO.

Las células cancerígenas fallan en su respuesta a la quimioterapia por muchas razones. Algunos investigadores dudan en la relevancia de los mecanismos bioquímicos de la resistencia a drogas porque factores relativos al hospedador, tales como absorción de droga, distribución, metabolismo, excreción y el fallo en el desarrollo de una dosis adecuada, no son los únicos que pueden influir en la respuesta de los tumores. Otros factores importantes a tener en cuenta son el tamaño tumoral, cinética celular, suministro vascular, inmunocompetencia, grado de oxigenación y pH. Las células cancerígenas pueden mostrar resistencia intrínseca o adquirida a alguna droga por muchos mecanismos diferentes (Masters, 1990).

El desarrollo de nuevos agentes, que puedan tener diferentes mecanismos y puntos de acción será de especial interés; así como la investigación de nuevos objetivos celulares. En este sentido será importante el estudio de la especificidad de agentes contra las células malignas (Rankin y Kaye, 1990).

En un futuro habrá que poner más énfasis en los oncogenes, factores de crecimiento, mensajeros intra e intercelulares y los factores que regulan la expresión de los genes. Determinados genes y sus productos podrían ser objetivos atacados por secuencias de nucleótidos complementarias con las que hibriden y se podría conseguir así la inhibición de la expresión de secuencias específicas de ADN y ARN. De la misma forma, el modelado molecular resultará en la producción de estructuras químicas que se podrían unir estrechamente, inhibiendo moléculas específicas. Así, las drogas contra el cáncer en el futuro serán más específicas (*Rankin y Kaye, 1990*), aunque esto no es garantía de que sean más efectivas. El ADN será reemplazado por la membrana celular como objetivo principal. Mediante la determinación de las bases moleculares de la sensibilidad a las drogas, podría ser posible extender el éxito de la quimioterapia a más pacientes (*Masters, 1990*).

II.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Tal y como han descrito otros autores (*LaQuaglia et al., 1991*), es posible seleccionar células multirresistentes mediante exposición e incremento gradual de la concentración de agentes citotóxicos en el medio de cultivo. Se ha visto que las células resistentes a un agente lipofílico como colchicina o actinomicina D, desarrollan resistencia cruzada frente a otros agentes lipofílicos como vincristina, vinblastina y doxorubicina (*Ling y Thompson, 1973*), y además sobreexpresan la Gp-P. Al fenotipo resultante se le conoce como resistencia a múltiples drogas o MDR.

En colon normal se expresan altos niveles del gen MDR1 (*Lum et al., 1993; Biedler, 1992; Niehans et al., 1992; Fojo et al., 1987; Harris y Hochhauser, 1992*) (tabla I.8), por lo que los adenocarcinomas de colon expresan también altos niveles del mismo y de su producto génico, la Gp-P; siendo intrínsecamente resistentes a las drogas (*Ma et al., 1987; Cordon-Cardo et al., 1990*).

Lo que se pretende en primer lugar es seleccionar, en un corto período de tiempo, una subpoblación de adenocarcinoma de colon humano por exposición continua a colchicina; para posteriormente estudiar el incremento de resistencia, la resistencia cruzada frente a otras drogas citotóxicas, la expresión de Gp-P y la reversión por verapamil; características éstas que definen al fenotipo MDR. Seguidamente se procederá a estudiar la evolución de los niveles de Gp-P, GSH y GST, a lo largo del proceso de selección.

El conocimiento de todos estos parámetros nos permitirá por un lado conocer las características fenotípicas MDR de esta sublínea celular, como modelo básico de estudio del fenómeno de resistencia a múltiples drogas; y por otro lado conocer la evolución que se pudiera producir en los dos mecanismos de resistencia más importantes que operan en células MDR, la Gp-P y GSH - GST.

El desarrollo de este estudio lleva implícito, en base a la metodología a utilizar, el propósito de poner a punto un método rápido (citometría de flujo) de detección de Gp-P y por tanto del fenotipo MDR, que podría ser utilizado en la detección de multirresistencia en biopsias de tumores.

La evaluación de la expresión de Gp-P y el estudio *in vitro* de la respuesta tumoral a los agentes antineoplásicos, en biopsias de tumores, podrían ser muy útiles como tests diagnósticos para la predicción de la respuesta tumoral a las drogas antineoplásicas, y por consiguiente en el diseño o alteración de protocolos quimioterapéuticos (*Roninson, 1992; Goldstein et al., 1989*).

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- LÍNEA CELULAR.

En la realización de este trabajo se utilizó una línea celular de adenocarcinoma de colon humano, suministrada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Málaga. Estas células proceden de un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado localizado en colon izquierdo, procedente de una mujer de 67 años. Las células fueron aisladas y cultivadas en el Dpto. de Bioquímica hasta la obtención de una línea homogénea y estable. Crecen en monocapa y son subcultivadas usando tripsina (0,05 %) y EDTA (0,02 %) en tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS) (*Morales et al., 1995; Griffiths, 1986; Hein et al., 1992*).

III.2.- REACTIVOS Y MEDIOS.

III.2.1.- Composición del medio de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó fue el RPMI-1640, el cual es suministrado comercialmente en forma de polvo liofilizado. Se encuentra preparado para proceder a su disolución en agua destilada-desionizada, permitiendo la reconstrucción de 1 litro de medio. Se utilizó la variedad comercial carente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Su composición química se recoge en la tabla III.1.

III.2.2.- Composición de la solución antibiótica-antimicótica PSF.

Con el fin de evitar la contaminación microbiana de los cultivos se utilizó una solución antibiótica-antimicótica PSF, 100 X; compuesta por penicilina-G, estreptomina y anfotericina-B (tabla III.2). El espectro de actuación abarca a bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras. Esta solución se almacenó congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se utilizó a una concentración del 1 % en el medio de cultivo.

III.2.3.- Composición de la solución salina balanceada de Hank (HBSS).

La solución salina balanceada de Hank (tabla III.3) se utilizó para los lavados celulares posteriores a las centrifugaciones así como para la eliminación de los restos de tripsina y drogas de las células. Por su contenido en glucosa se utilizó para recoger las suspensiones celulares tras la disgregación celular, permitiendo de esta forma el mantenimiento de las células en condiciones óptimas a 37 °C; durante el tiempo necesario para la manipulación de otras muestras o de sus protocolos. Para evitar la formación de grumos de células se utilizó la solución carente de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

III.2.4.- Composición del tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS).

El tampón fosfato PBS de Dulbecco (tabla III.4) se utilizó para diluir las drogas de ensayo; así como para los lavados celulares que se realizaron durante la preparación de las muestras, y los lavados de las placas petri previos a las tinciones de colonias. También se utilizó como sustituto de la solución salina balanceada de Hank. Para evitar la formación de grumos celulares se utilizó sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} .

Tabla III.1.- Composición química del medio de cultivo RPMI-1640.

| COMPONENTES | CONCENTRACIÓN (mg/L) |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| L-Arginina-HCl | 200 |
| L-Asparagina-H ₂ O | 56,82 |
| Ácido L-Aspártico | 20 |
| L-Cistina-2Na-H ₂ O | 62,92 |
| Ácido L-Glutámico | 20 |
| L-Glutamina | 300 |
| Glutación | 1 |
| Glicina | 10 |
| L-Histidina | 15 |
| L-Hidroxiprolina | 20 |
| L-Isoleucina | 50 |
| L-Leucina | 50 |
| L-Lisina-HCl | 40 |
| L-Metionina | 15 |
| L-Fenilalanina | 15 |
| L-Prolina | 20 |
| L-Serina | 30 |
| L-Treonina | 20 |
| L-Triptófano | 5 |
| L-Tirosina-2Na-2H ₂ O | 28,64 |
| L-Valina | 20 |
| Biotina | 0,2 |
| D-Pantotenato-Ca | 0,25 |
| Cloruro de Colina | 3 |
| Ácido Fólico | 1 |
| Mioinositol | 35 |
| Nicotinamida | 1 |
| Ácido p-Aminobenzoico | 1 |
| Piridoxina-HCl | 1 |
| Riboflavina | 0,2 |
| Tiamina-HCl | 1 |
| Vitamina B ₁₂ | 0,005 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 69,48 |
| KCl | 400 |
| MgSO ₄ -7H ₂ O | 100 |
| NaCl | 6000 |
| Na ₂ HPO ₄ | 800,7 |
| D-Glucosa | 2000 |
| Rajo Fenol-Na | 5 |

Tabla III.2.- Composición química de la solución PSF (100 X).

| COMPONENTES | CONCENTRACION | |
|------------------------|---------------|-------|
| Penicilina-G Sódica | 10000 | UI/ml |
| Estreptomicina Sulfato | 10 | mg/ml |
| Anfotericina B | 25 | µg/ml |
| NaCl | 0,9 | % |

Tabla III.3.- Composición química de la solución salina balanceada de Hank (HBSS).

| COMPONENTES | CONCENTRACION (mg/L) |
|----------------------------------|----------------------|
| KCl | 400 |
| KH ₂ PO ₄ | 60 |
| NaCl | 8000 |
| Na ₂ HPO ₄ | 4,75 |
| D-Glucosa | 1000 |
| Rojo Fenol•Na | 10 |

Tabla III.4.- Composición química del tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS).

| COMPONENTES | CONCENTRACION (mg/L) |
|----------------------------------|----------------------|
| NaCl | 8000 |
| KCl | 200 |
| Na ₂ HPO ₄ | 1150 |
| KH ₂ PO ₄ | 20 |

III.2.5.- Drogas.

Las drogas utilizadas fueron colchicina (CCH) (MERCK, Darmstadt), mitomicina C (MMC) (INIBSA, Barcelona), vincristina sulfato (VCR) (LILLY, Madrid) y vinblastina sulfato (VBL) (LILLY, Madrid). Los stocks se prepararon con agua destilada estéril (*Chatterjee et al., 1990*) a una concentración de 1 mg/ml, se filtraron por 0,22 μm (*Mitsuhashi et al., 1992*) y las alicuotas se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El verapamil (VRP) (KNOLL AG, Ludwigshafen) se disolvió en PBS (1 mg/ml) y tras ser filtrado por 0,22 μm se congeló, igualmente, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Lemontt et al., 1988*). Tanto las drogas como el verapamil fueron diluidos en PBS estéril para su uso, el cual se realizó inmediatamente después de ser descongelados (*Twentyman et al., 1990b*). El verapamil que se utilizó estaba constituido por una mezcla racémica de sus isómeros (L)- y (R)-.

Las drogas se añadieron a 5 - 10 ml de medio de cultivo en volúmenes comprendidos entre 50 - 150 μl (*Twentyman et al., 1990a*).

III.2.6.- Anticuerpos monoclonales.

Para el estudio de los niveles de glicoproteína P-170 se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón JSB-1 (Sera-Lab) de la clase IgG1, contra la Gp-P codificada por el gen MDR (*Volm et al., 1992*). La solución de anticuerpos fue alicuotada y almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para la detección por citometría de este primer anticuerpo se utilizó un segundo anticuerpo de cabra marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC), específico para los anticuerpos (IgG) de ratón.

Para la realización de las tinciones se usó un segundo anticuerpo específico para IgG, marcado con actividad fosfatasa.

Especificidad.

El anticuerpo JSB-1 reacciona con el epítipo citoplásmico intracelular de la glicoproteína de 170 kDa. Está situado en su región C-terminal y su expresión está fuertemente correlacionada con el grado de multirresistencia a drogas encontrada en líneas celulares MDR humanas y animales. Detecta Gp-P en tejidos malignos y normales, incluyendo riñón, adrenal y colon.

El segundo anticuerpo marcado con FITC es específico para IgG de ratón y reacciona con las subclases G1, G2a, G2b y G3. El anticuerpo marcado con actividad fosfatasa, usado en las tinciones, es específico para IgG.

III.3.- APARATAJE DE LABORATORIO.

Para la realización del trabajo experimental se ha utilizado un incubador de CO₂ de la marca Selecta (fig. III.1); una cabina de flujo laminar vertical, TC-72 Gelaire Flow laboratories (fig. III.2); termo de nitrógeno líquido, MVE SC 20/15; microscopio óptico de contraste de fases, Nikon THS; microscopio óptico convencional; autoclave de sobremesa, Matachana; centrífuga de sobremesa, Orto mod. Sunlay; estufa de secado, Selecta; balanza de precisión, Chyo MK-50C; pH-metro, Crison mod. micropH 2001; baño termostático, Gri-Cel; agitador magnético, Agimatic-N Selecta y citómetro de flujo, FACScan Becton Dickinson. En la figura III.3 se puede observar una vista parcial del laboratorio, donde se aprecian algunos de estos equipos.



Figura III.1.- Incubador de CO₂, marca Selecta.
Arriba: Vista general. **Abajo:** Detalle de los cultivos.



Figura III.2.- Cabina de flujo laminar vertical, marca TC-72 Gelaire-Flow laboratories.



Figura III.3.- Vistas parciales del laboratorio de cultivos celulares.

III.4.- CONDICIONES DE ESTERILIDAD.

Con el objeto de evitar en lo posible la contaminación de los cultivos, se mantuvieron unas condiciones de asepsia y esterilidad lo más exhaustivas posibles. Las bacterias, micoplasmas, levaduras y esporas de hongos pueden ser inoculadas al cultivo a través de las manipulaciones del operador, el aire, las superficies de trabajo o las soluciones y materiales empleados.

Todas las manipulaciones que se realizaron directamente con el material y los cultivos, tales como filtrado de medios y soluciones, cambios de medio, lavados, inoculaciones en flask o placas petri, resiembras, entre otros; fueron desarrolladas en el interior de la cabina de flujo laminar. Ésta, dispone de un tubo ultravioleta que permaneció encendido constantemente mientras la campana estaba fuera de uso.

El material estéril; como botes, pipetas, flask, placas petri, entre otros; sólo se abrió en el interior de la cabina de flujo laminar.

Las superficies de trabajo se desinfectaron con alcohol 70 %. Durante las noches se mantuvieron encendidos en el laboratorio dos tubos fluorescentes de luz ultravioleta, con el fin de esterilizar el aire y todas las superficies. El laboratorio dispone de un impulsor de aire estéril que asegura en todo momento la renovación del aire.

III.4.1.- Esterilización del material.

Material de vidrio.

Se usaron pipetas de vidrio de 1, 2, 5, 10 y 25 ml., así como botes de diferentes volúmenes, los cuales fueron esterilizadas mediante autoclave a 121 °C, 20 minutos.

Reactivos y medios.

Los medios de cultivo así como las soluciones y reactivos utilizados directamente para el cultivo celular fueron esterilizados mediante filtración por membrana de 0,22 μm \varnothing , excepto las soluciones salinas que se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 20 minutos. Se utilizó agua destilada desionizada ultrapura obtenida tras filtrado por sistema Millipore, la cual fue esterilizada por autoclavado.

Material plástico.

Se utilizó material de plástico desechable, como flask, placas petri, placas multiwell, tubos de ensayo y pipetas Pasteur. Para la filtración por membrana se utilizaron portafiltros de plástico esterilizables por autoclavado.

III.5.- EQUIPO INFORMÁTICO.

III.5.1.- Hardware.

Para el análisis de los datos, resultados y edición de la Tesis se utilizó un ordenador compatible PC-486, DX2 a 66 Mhz así como impresora de inyección Epson Stylus color ESC P-2 e impresora láser Unisys.

III.5.2.- Software.

El software utilizado para la edición de la Tesis fue el programa Microsoft-Word 6.0. Para el estudio estadístico se usó el programa Statistix 4.1; para la edición de las figuras, el programa Harvard Graphics 3.0 y para la realización de los cálculos, la hoja de cálculo Excel 4.0.

III.6.- CULTIVO CELULAR.

Para la obtención de biomasa celular y mantenimiento de las líneas se utilizaron flask de 75 cm², mientras que los ensayos se realizaron en placas petri de 25 cm².

III.6.1.- Línea celular parental.

Las células de adenocarcinoma de colon humano fueron cultivadas *in vitro* en medio RPMI-1640 (con L-glutamina, sin calcio ni magnesio), suplementado con tampón hepes 1 M (15 ml/L), bicarbonato sódico 7,5 % (28 ml/L), 10 % suero de ternera inactivado por calor y 1 % de solución antibiótica-antimicótica 100 X (PSF, Gibco); a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂ en aire (Morales *et al.*, 1995; Komiyama *et al.*, 1989; Schwachöfer *et al.*, 1989; Gekeler *et al.*, 1988).

El pH del medio se ajustó a 7,4 usando HCl (1 N) y/o NaOH (1 N), con la ayuda de un pH-metro y posteriormente fue filtrado por 0,22 µm.

III.6.2.- Sublínea celular seleccionada con colchicina.

La sublínea celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) fue cultivada en medio RPMI-1640 suplementado de la misma forma que la línea parental; con la excepción de que estas células requerían la presencia continua de colchicina en el medio a una dosis de 1 µg/ml (Volm *et al.*, 1988; Cano-Gauci y Riordan, 1987). Esta dosis de droga se le añadió al medio para que las células no perdieran progresivamente, con el paso del tiempo, la resistencia que pudieran haber adquirido a la droga con la que fueron seleccionadas; es decir, que no revirtiera su resistencia y se volvieran nuevamente sensibles.

III.6.3.- Disgregación celular y subcultivos.

Estas células crecen en monocapa y fueron subcultivadas usando tripsina (0,05 %) y EDTA (0,02 %) en tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS) (*Morales et al., 1995; Hein et al., 1992; Griffiths, 1986*). El medio de cultivo se renovó cada 3 - 4 días (*Marx et al., 1988*) y una vez que se alcanzó confluencia, se procedió a una nueva resiembra. De esta forma se aseguró la presencia en el medio de una concentración de nutrientes y factores de crecimiento óptimos, consiguiéndose así el mantenimiento del cultivo en fase exponencial de crecimiento (*Chatterjee et al., 1990*).

Siembras.

Una vez tripsinizadas las células y obtenida una suspensión celular uniforme se procedió a realizar un recuento en la cámara de Neubauer, usando azul trypan como tinción vital. Las células se mantuvieron en un tubo de ensayo inmerso en baño termostático a 37 °C, hasta la siembra. Posteriormente se procedió a inocular alicuotas de la suspensión celular (100 - 1000 µl) en flask conteniendo medio de cultivo suplementado a 37 °C. La densidad celular sembrada por cada flask osciló entre 5×10^4 y 10^5 células.

III.7.- RECUENTO CELULAR.

Los recuentos celulares se realizaron en cámara de Neubauer, utilizando el colorante vital azul trypan (0,4 %). Se determinó el número de células totales y el número de células viables.

El colorante azul trypan es una de las tinciones de exclusión recomendadas para el recuento de células viables. El método se basa en que las células vivas (viables) no incorporan determinados colorantes, mientras que las células muertas (no viables) sí lo hacen. Además, la tinción facilita la visualización de la morfología celular.

Tras obtener una suspensión celular inmersa en la solución de Hank (HBSS), se preparó la tinción en un tubo de ensayo. Esta tinción se compone de 0,5 ml de solución azul trypan (0,4 %) (w/v) en 0,3 ml de PBS. Se procedió a añadirle 0,2 ml de suspensión celular y una vez bien mezclada se dejó reposar durante 5 a 15 minutos. Tras colocar el cubreobjetos en la cámara de Neubauer, se procedió con el uso de una pipeta Pasteur a transferir una pequeña cantidad de suspensión celular teñida a ambas cámaras del hemocitómetro, las cuales se llenan por capilaridad. Se realizó el recuento celular de ambas cámaras, tanto en el cuadrado central (1 mm) como en los cuatro cuadrados de las esquinas (1 mm). Las células no viables aparecen teñidas de azul. Se contaron las células localizadas sobre las líneas centrales superior e izquierda del perímetro de cada cuadrado y no las del lado derecho e inferior (fig. III.4). El procedimiento se repitió en la segunda cámara.

El factor de dilución fue 5. Las células no fueron expuestas al azul trypan por un período prolongado, ya que pasados 15 minutos las células viables también incorporan el colorante.

III.7.1.- Porcentaje de células viables.

Una vez realizado el recuento se calculó el porcentaje de células viables (relación entre el número de células no teñidas y las células totales), mediante la expresión:

$$\% \text{ Células viables} = \frac{N^{\circ} \text{ células viables (no teñidas)}}{\text{Células totales (teñidas y no teñidas)}} \times 100$$

III.7.2.- Número de células/ml.

Cada cuadrado del hemocitómetro, con el cubreobjetos colocado, representa un volumen total de $0,1 \text{ mm}^3$ o 10^{-4} cm^3 . Como 1 cm^3 es equivalente a 1 ml, tenemos que el número de células/ml se calcula según la expresión:

$$N^{\circ} \text{ células/ml} = N^{\circ} \text{ medio de células por cuadrado} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

A partir del resultado podemos deducir el número total de células presentes en la suspensión de origen:

$$\text{Células totales} = N^{\circ} \text{ células/ml} \times \text{volumen de la suspensión original}$$

En cada recuento se contaron 10 cuadrículas del hemocitómetro.

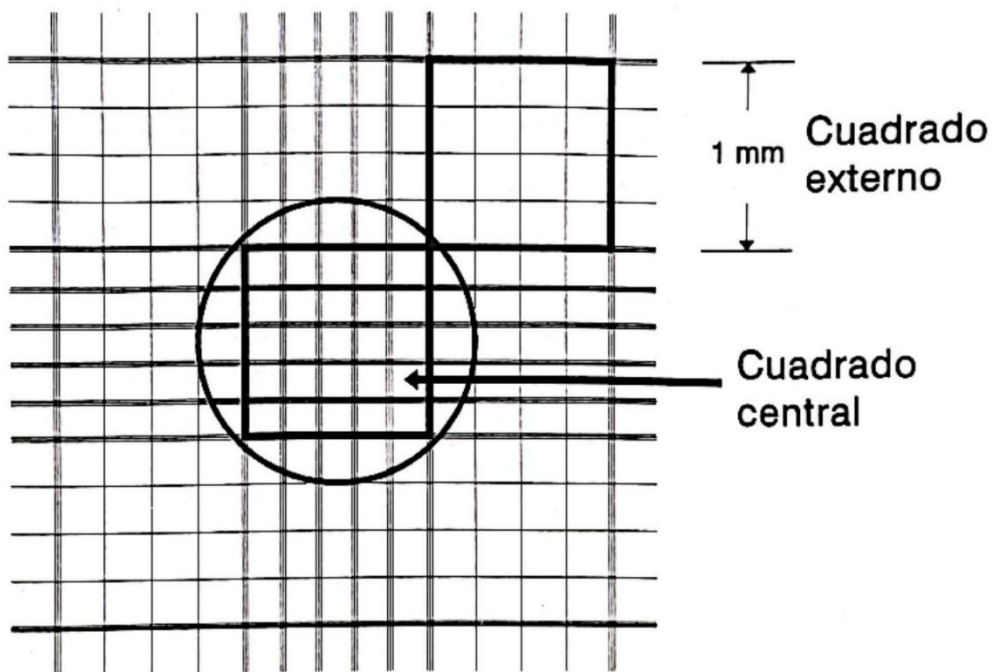


Figura III.4.- Representación de una cámara de Neubauer o Hemocitómetro.

En la figura se representa una de las cámaras. El círculo indica el área aproximada cubierta por el microscopio a 100 X. Se cuentan las células de las cuadrículas de $1 \times 1 \text{ mm}$. Si coinciden con las líneas de los cuadros se cuentan siempre las que coinciden con las de arriba y la izquierda. El recuento se realiza en el cuadrado central y en los cuatro cuadros de las esquinas.

III.8.- CRIOPRESERVACIÓN DE MUESTRAS.

La criopreservación de las muestras se realizó en nitrógeno líquido. Para ello se utilizaron criotubos de 1,8 ml., los cuales se almacenaron sumergidos completamente en nitrógeno líquido hasta su preparación.

III.8.1.- Congelación.

La congelación se realizó añadiendo al medio un agente crioprotector. Sin él, la congelación es letal para la mayoría de las células de mamíferos. El daño causado consiste en daño mecánico provocado por la formación de cristales de hielo, concentración de electrolitos, deshidratación, cambios de pH y desnaturalización de proteínas. Los agentes crioprotectores que se suelen usar son el dimetil-sulfóxido (DMSO) y el glicerol (Hay, 1986).

El medio de congelación estaba compuesto por RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero de ternera inactivado por calor y 10 % (v/v) de dimetil-sulfóxido (DMSO), que actúa como agente crioprotector (Bell *et al.*, 1985). A partir de cultivos en fase logarítmica se obtuvo por tripsinización una suspensión celular homogénea. Seguidamente se centrifugaron las células a 2000 rpm 5 minutos y se resuspendieron en medio de congelación, a 4 °C. La concentración celular obtenida fue entre 10^6 y 10^7 células/ml. Se distribuyó la suspensión celular en alícuotas de 1 ml por criotubo y se mantuvieron durante 10 minutos en hielo picado a 4 °C; para posteriormente pasarlos a -20 °C, durante 1 hora. A continuación se introdujeron rápidamente en el termo de nitrógeno líquido, donde permanecieron almacenados hasta su preparación (Hay, 1986).

III.8.2.- Descongelación.

La descongelación de los criotubos se realizó lo más rápidamente posible. Para ello se sacaron del termo de nitrógeno líquido y se sumergieron en agua termostaticada a 37 °C. Una vez descongelados se agitaron suavemente con el fin de homogeneizar la suspensión

celular y se centrifugó a 2000 rpm, 5 minutos. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se procedió a lavar las células (2 veces) con medio de cultivo a 37 °C, centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos. Para iniciar el cultivo se procedió a inocular, con alicuotas de la suspensión celular, varios flask que contenían 5 ml de medio de cultivo suplementado. Posteriormente se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂/aire (Hay, 1986).

III.9.-SELECCIÓN CON COLCHICINA DE SUBLINEAS CELULARES.

Se seleccionó una sublínea celular resistente mediante cultivo continuo en presencia de colchicina (Pirker et al., 1990; Fojo et al., 1985) (0,5 µg/ml) durante 10 semanas (Boiocchi y Toffoli, 1992). Para ello, se sembraron 5×10^5 células en un flask que contenía medio de cultivo suplementado con la droga; y tras alcanzar confluencia (7 días) se tripsinizó y se volvió a resembrar en nuevo medio a la misma dosis de droga (Twentyman et al., 1990a). El proceso se repitió hasta completar 10 semanas. Posteriormente, se sembraron 1×10^3 células por placa petri y se expusieron a 0,5, 1 y 10 µg/ml de colchicina hasta la formación de colonias (7 - 10 días) (Pirker et al., 1990; Kartner et al., 1983b). Las colonias resistentes, que sólo aparecieron para la dosis de 1 µg/ml, se picaron con una pipeta Pasteur estéril y fueron resembradas en medio nuevo que contenía 1 µg/ml de colchicina (fig. III.5) (Komiyama et al., 1989; Lemontt et al., 1988; Cano-Gauci y Riordan, 1987). Se seleccionaron 4 clones, que se denominaron HCA-1/1^{CCH}, HCA-2/1^{CCH}, HCA-3/1^{CCH} y HCA-4/1^{CCH}. Fueron cultivados en flask de 75 cm² hasta alcanzar confluencia y se determinó la resistencia del clon HCA-2/1^{CCH}.

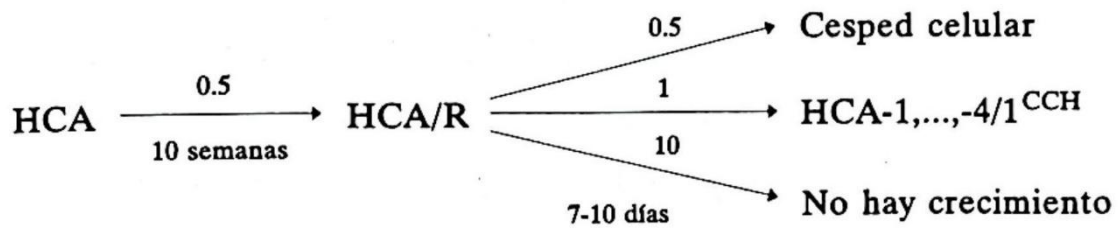


Figura III.5.- Protocolo de selección de la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Las concentraciones de droga vienen dadas en $\mu\text{g/ml}$. Durante el primer paso de selección las células fueron resembradas cada 7 días hasta completar 10 semanas; posteriormente se sembraron placas petri con diferentes dosis de colchicina y se picaron las colonias resistentes, que sólo aparecieron para la dosis de $1 \mu\text{g/ml}$ de droga. Se seleccionaron 4 clones resistentes.

HCA: Adenocarcinoma de colon humano. HCA/R: Sublínea de adenocarcinoma de colon resistente. CCH: Colchicina.

III.10.- ENSAYOS CLONOGÉNICOS.

Los ensayos clonogénicos constituyen una buena técnica para estudiar la supervivencia y capacidad proliferativa de las células en cultivo tras ser expuestas a determinados tratamientos químicos y/o físicos. Presentan un enorme interés en el estudio *in vitro* de la eficacia de las drogas antineoplásicas como citostáticos. Se pueden realizar tanto en medio sólido (agar blando) como en medio líquido (monocapa).

Se procedió a estudiar el efecto de varias drogas sobre la supervivencia celular mediante ensayos clonogénicos en monocapa (medio líquido). La inhibición en la formación de colonias se tomó como medida de la citotoxicidad de la droga (*Pirker et al., 1990*). Las células se mantuvieron en cultivo exponencial en medio libre de droga durante 5 días antes de realizar el ensayo, para que así eliminaran la droga endógena (colchicina) (*Cano-Gauci y Riordan, 1987; Gekeler et al., 1988; Fojo et al., 1985*). Posteriormente, se sembraron 300 células (*Cano-Gauci y Riordan, 1987; Warr et al., 1988; Mechetner y Roninson, 1992*) por placa petri (60 mm \varnothing) en 5 ml de medio de cultivo (*Marx et al., 1988*). Al día siguiente se expusieron a diferentes dosis de droga durante 1 hora (*Wilson, 1986; Lemontt et al., 1988; Busch et al., 1990; Inaba et al., 1979*). Tras retirar el medio y lavar con medio fresco, se cultivaron durante 7-10 días en 5 ml de medio libre de droga, hasta la formación de colonias (*Neale y Matthews, 1989; Komiyama et al., 1989*). Posteriormente se procedió a la tinción

de las colonias, la cual se realizó con una solución fijación-tinción, que contenía: azul de metileno (2 %), metanol (75 %) en agua destilada (*Pirker et al., 1990; Kartner et al., 1983b*). Se determinó el número de colonias por placa petri mediante recuento directo y se calculó la fracción superviviente utilizando las expresiones:

$$PE = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{N^{\circ} \text{ células sembradas}} \qquad FS = \frac{PE \text{ grupo tratado}}{PE \text{ control}}$$

PE: Plating efficiency o eficiencia en la formación de colonias.

FS: Fracción superviviente.

Los resultados se expresaron como fracción superviviente frente a concentración de droga. Los ensayos se realizaron por triplicado.

III.11.- ENSAYOS DE RESISTENCIA CRUZADA FRENTE A DROGAS ANTITUMORALES.

Con objeto de estudiar la posibilidad de que el clon celular seleccionado con colchicina presentara resistencia cruzada con otras drogas antineoplásicas, se procedió a estudiar, mediante ensayos clonogénicos en monocapa, la supervivencia celular frente a otras drogas; tales como: vinblastina, vincristina y mitomicina C. Los ensayos clonogénicos se realizaron tal y como se describe en el punto anterior. El tiempo de exposición fue de 1 hora (*Cano-Gauci y Riordan, 1987; Wilson, 1986; Lemontt et al., 1988; Busch et al., 1990*).

El rango utilizado en las dosis de droga osciló entre 0,01 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Se intercalaron grupos control en cada ensayo, a los que no se les añadió droga alguna. Los controles fueron sometidos al mismo protocolo de cultivo.

III.11.1.- Efecto del verapamil sobre la reversión de la resistencia a drogas antineoplásicas.

El estudio de la posible reversión por verapamil de la resistencia a las drogas antitumorales ensayadas, se realizó igualmente mediante ensayo clonogénico en monocapa, según la técnica descrita. Para ello se expusieron las células resistentes seleccionadas (HCA-2/1^{CCH}) a diferentes drogas, en presencia de verapamil (10 µg/ml) (*Fojo et al., 1985; Komiyama et al., 1989; Bowles et al., 1990; Goodman et al., 1987*).

El tiempo de exposición fue de 1 hora. Las células estuvieron expuestas durante el mismo tiempo tanto al verapamil como a las drogas (*Cano-Gauci y Riordan, 1987*). El rango de dosis de drogas utilizado osciló entre 0,01 y 100 µg/ml. En un segundo ensayo se aumentó la dosis de verapamil a 25 µg/ml (*Woodcock et al., 1993*).

Se intercalaron grupos control en cada ensayo, a los que no se les añadió droga alguna, aunque sí contenían la concentración de verapamil requerida. Los controles fueron sometidos al mismo protocolo de cultivo.

III.12.- NIVELES DE GLICOPROTEÍNA-P.

Los niveles de Gp-P fueron determinados mediante microscopía óptica y citometría de flujo. En ambos casos se utilizó el anticuerpo monoclonal JSB-1.

III.12.1.- Microscopía óptica.

Con el fin de comprobar visualmente la presencia de Gp-P en las membranas celulares de las células seleccionadas, se realizó una tinción inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal JSB-1, específico para la glicoproteína P-170, y un segundo anticuerpo marcado con actividad fosfatasa (*Ma et al., 1987*).

Se procedió a fijar con formol al 4 %, durante 30 - 40 minutos, la monocapa celular crecida en placas petri. Seguidamente, tras lavar con agua destilada y con PBS Dulbecco's se añadió a las placas el anticuerpo monoclonal JSB-1 (*Nygren y Larsson, 1990*). Se incubaron durante 20 minutos a 37 °C, tras lo cual se volvieron a lavar con PBS Dulbecco's. Posteriormente se les añadió el segundo anticuerpo anti IgG marcado con actividad fosfatasa, el cual se incubó 10 minutos a 37 °C. Se lavaron nuevamente con PBS Dulbecco's y se les añadió fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina, incubándose 10 minutos a 37 °C. A continuación y tras volver a lavar con PBS Dulbecco's, se les añadió el sustrato cromógeno naftol fosfato en tampón tris, manteniéndose 20 minutos a 37 °C. Una vez lavadas con PBS Dulbecco's y agua destilada, se tiñeron las preparaciones con hematoxilina durante un minuto; procediéndose a continuación al montaje en Aquatex (MERCK) (*Arceci et al., 1993; Kartner et al., 1985*).

III.12.2.- Citometría de flujo.

Con el fin de poder estudiar, de forma semicuantitativa, el contenido en Gp-P de las células durante el proceso de selección, se midió la fluorescencia de las poblaciones celulares. Se utilizó un anticuerpo específico para Gp-P. Este anticuerpo fue a su vez reconocido por un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC); molécula que emite fluorescencia al ser excitada por la luz láser del citómetro (*Boiocchi y Toffoli, 1992; Mechetner y Roninson, 1992; Pizarro et al., 1992; Van Dam et al., 1992*).

Se utilizó, además, una tinción para ADN mediante ioduro de propidio (IP); molécula que se intercala entre las bases de ADN y emite fluorescencia al ser excitada por la luz láser del citómetro.

La emisión de fluorescencia de ambas moléculas (FITC e IP) no presenta interferencias. La longitud de onda de excitación del IP oscila entre 488 - 495 nm y la de emisión entre 630 - 639 nm (color rojo). En contraposición, la longitud de onda de excitación del FITC es de 495 nm y la de emisión de 525 nm (color verde).

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente forma:

Una vez disgregadas las células (2×10^6) con una solución no enzimática a 37 °C, se procedió a centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS Dulbecco's y se fijaron en metanol 70 % en agua destilada durante 30 - 40 minutos, a 4 °C y en oscuridad. Una vez fijadas se lavaron dos veces con PBS Dulbecco's, se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos y se resuspendieron en 1 ml de solución conteniendo el anticuerpo monoclonal JSB-1 (Nygren y Larsson, 1990), anti Gp-P (Volm et al., 1992). Se usó una dilución 1/25 en PBS Dulbecco's. Se incubaron durante 1 hora a 4 °C en oscuridad y posteriormente se lavaron dos veces con PBS Dulbecco's. Seguidamente se procedió a la incubación con yoduro de propidio (125 µg/ml) (Morales et al., 1995) y con el segundo anticuerpo marcado con FITC, para lo que se añadió 1 ml de solución conteniendo dicho anticuerpo a una dilución 1/50 y 100 µl de yoduro de propidio en PBS Dulbecco's. La incubación se realizó durante 1 hora a 4 °C y en oscuridad (Kimura et al., 1991), tras la cual se procedió a leer la fluorescencia en citómetro de flujo FACScan Becton-Dickinson, usando el software Lysys II (Arceci et al., 1993; Kartner et al., 1985).

Se leyó un mínimo de 30000 células en cada muestra y los ensayos se realizaron por triplicado. A los histogramas obtenidos se les eliminó automáticamente el ruido de fondo.

Disgregación celular no enzimática.

La solución para disgregación no enzimática está diseñada para despegar las células de la superficie del cultivo del flask, sin causarles daño. Está preparada en la solución salina balanceada de Hank y contiene EDTA, glicerol y citrato sódico. No contiene proteínas y permite la separación celular sin el uso de enzimas. Las proteínas celulares están preservadas sin modificación enzimática o adsorción de proteínas extrañas. Es útil en estudios inmunoquímicos dependientes del reconocimiento de proteínas de la membrana plasmática.

Se procedió a calentar la solución en baño termostático a 37 °C y tras eliminar por aspiración el medio de cultivo de los flask, se lavaron con PBS Dulbecco's precalentado a 37 °C. Seguidamente se añadió 1 ml de solución de disgregación celular no enzimática y se

incubó de 2 a 5 minutos a 37 °C. Una vez que las células comenzaron a desprenderse de la superficie, se añadió a cada flask 3 ml de medio de cultivo suplementado y se pipeteó con pipeta Pasteur varias veces para disgregar los grumos celulares. Posteriormente se lavaron las células con solución de Hank y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente se resuspendieron en medio de congelación a 4 °C, prosiguiendo a continuación con el protocolo de congelación de muestras descrito anteriormente.

III.13.- CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH).

Tras obtener una suspensión celular homogénea mediante tripsinización, las muestras se diluyeron (1/5 w/v) en una solución de ácido 5-sulfosalicílico al 5 %, para posteriormente ser homogeneizadas en un Potter de vidrio. Los homogeneizados se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes obtenidos fueron a su vez centrifugados a 10000 g durante 5 minutos. Los nuevos sobrenadantes se usaron para la determinación del contenido en glutatión total (GSH) mediante el método de la reductasa DTNB-GSSG descrito por Anderson, (1985). La solución de ensayo contenía 143 mM de tampón fosfato sódico (pH 7,5), 6,3 mmol/l EDTA, 0,248 mg/ml NADPH, 6 mmol/l ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), 2,5 µl glutatión reductasa (266 U/ml) y 10 µl de muestra (Gálvez *et al.*, 1994).

La concentración de GSH fue obtenida a partir de una curva estándar, en la cual los niveles de GSH presentes fueron representados frente a la tasa de cambio de absorbancia a 412 nm. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Los valores obtenidos se expresaron como µM GSH y como µmol GSH/10⁴ células.

La determinación del contenido en proteínas se realizó mediante el método de Bradford, (1976); usando albumina de suero bovino como proteína estandar.

III.14.- ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST).

La actividad glutatión S-transferasa (GST) fue medida por el método descrito por Warholm *et al.*, (1985). La mezcla de ensayo contenía 0,1 M de tampón fosfato potásico (pH 7,0), 1 mmol/l EDTA, 0,1 mmol/l GSH, 1 mmol/l 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y la cantidad adecuada de muestra (solución enzimática) conteniendo 25 µg de proteínas totales. El ensayo enzimático se realizó a 37 °C. La actividad específica fue expresada como µmol de GST conjugado/minuto/25 µg de proteína. Todas las medidas se realizaron por duplicado (Gálvez *et al.*, 1994).

La determinación del contenido en proteínas se realizó mediante el método de Bradford, (1976); usando albumina de suero bovino como proteína estándar.

III.15.- ESTADÍSTICA.

En primer lugar se procedió al estudio de la normalidad de los datos y tras comprobar que las variables seguían una distribución Normal, se realizaron las pruebas estadísticas paramétricas t-Student y Análisis de la Varianza de I vía (ANOVA-I). Se tomó un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$) para todos los casos.

III.15.1.- Normalidad de los datos.

Se utilizó el test de aproximación de Wilk-Shapiro Rankit-Plot. Este test examina si una variable sigue una distribución Normal. Los valores se ordenaron por rango, siendo el primero de ellos el valor esperado para el primer orden estadístico de la muestra; asumiendo que la muestra provino de una distribución Normal. Los órdenes estadísticos de una muestra son los valores de la muestra reordenados por su rango. Si la muestra sigue una distribución Normal, se obtendría una línea recta al representar los rangos frente a los órdenes estadísticos; excepto para la distribución aleatoria. La aproximación Wilk-Shapiro es el

cuadrado de la correlación lineal entre los rangos y los órdenes estadísticos. Un valor pequeño de la aproximación Wilk-Shapiro así como una representación no lineal entre rangos y órdenes estadísticos sería indicativo de la no normalidad de la variable.

III.15.2.- Test t-Student.

Se utilizó el test t-Student para dos muestras independientes ($n \leq 30$). Este test muestrea las diferencias entre las medias de dos muestras independientes. Es aplicable a situaciones donde las muestras pertenecen a dos poblaciones o grupos independientes distribuidos normalmente. La hipótesis nula que se planteó fue que las medias para los dos grupos o poblaciones eran iguales, por lo que las diferencias entre ambos grupos no eran significativas; y por tanto las muestras pertenecen a la misma población.

III.15.3.- Análisis de la Varianza de I vía (ANOVA-I).

Este test muestrea para igualdad de varianzas entre las variables a ensayar. El test F asume que la varianza es la misma para cada grupo o tratamiento (tabla III.5).

Tabla III.5.- Ejemplo de tabla obtenida para el Análisis de la Varianza (ANOVA-I).

| FUENTE DE VARIACION | DF | SS | MS | F | P |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| ENTRE VARIABLES | 1 | 0,29172 | 0,29172 | 144,95 | 0,0001 |
| EN LAS VARIABLES | 5 | 0,01006 | 0,00201 | | |
| TOTAL | 6 | 0,30178 | | | |

La variación observada en las variables es considerada en este modelo como error.

DF: Grados de libertad. SS: Suma de cuadrados. MS: Cuadrado medio. F: Test aplicado. P: Probabilidad asociada.

IV.- RESULTADOS

IV.1.-SELECCIÓN CON COLCHICINA DE SUBLINEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO.

Tras el proceso de selección se obtuvieron, aislaron y seleccionaron 4 clones celulares de entre todos los que habían crecido en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina. Se denominaron HCA-1,...,-4/1^{CCH} y fueron expuestos a diferentes dosis de colchicina con objeto de discernir mediante ensayos clonogénicos, cuál de estas sublíneas celulares presentaba mayor resistencia; obteniéndose los resultados presentados en la figura IV.1. La sublínea HCA-2/1^{CCH} presentó un mayor valor de ID₅₀, por lo que fue ésta la población celular elegida para estudiar el fenotipo MDR.

En la figura IV.2 se muestra una imagen, tomada a microscopía óptica de contraste de fases, de la línea parental de adenocarcinoma de colon (HCA) y la sublínea seleccionada elegida para el estudio (HCA-2/1^{CCH}). La población celular resistente seleccionada presentó una morfología más redondeada y con menos anclajes sobre el sustrato. Por otro lado, no se observaron diferencias en cuanto al contenido citoplasmático o disposición y número de nucleólos. En ambas poblaciones se observó la presencia de células aberrantes, caracterizadas por su gran tamaño y por presentar entre 4 y 15 núcleos por célula.

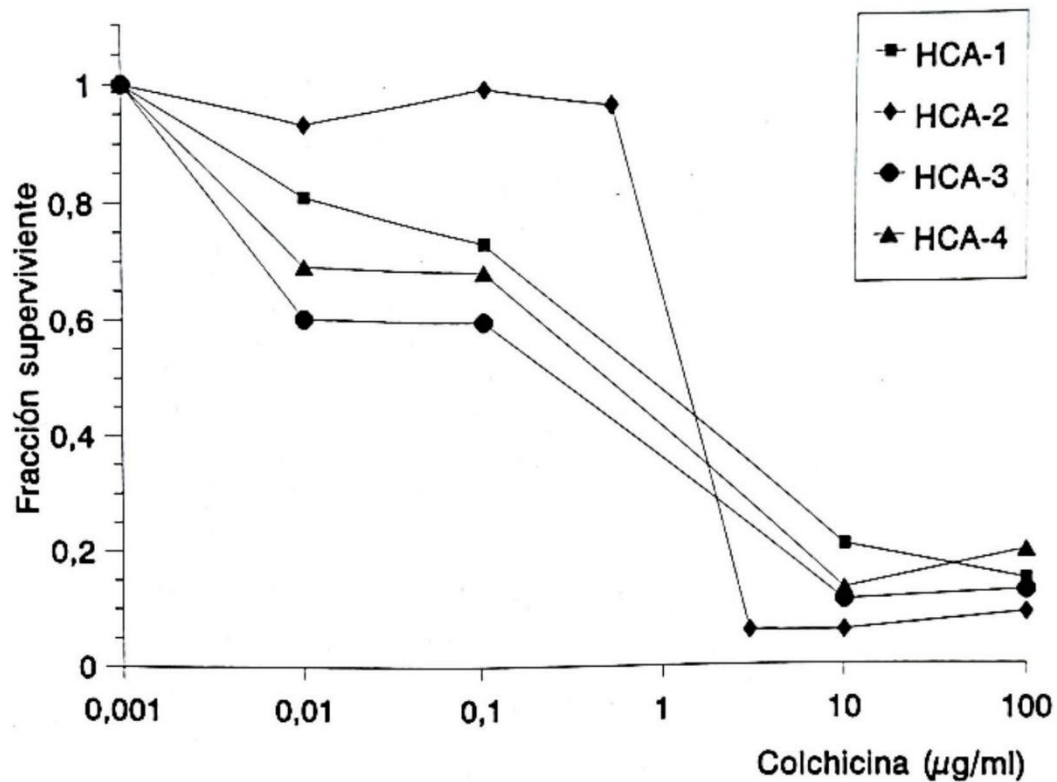


Figura IV.1.- Curvas dosis-respuesta frente a colchicina, de los cuatro clones de adenocarcinoma de colon humano aislados (HCA-1,...,-4/1^{CCH}).

Cada punto representa la media de tres experimentos. La fracción superviviente es la relación entre las eficiencias de planqueo del grupo tratado respecto al control. El clon HCA-2/1^{CCH} es el que presenta un mayor valor de ID₅₀, por lo que fue ésta la población celular elegida para estudiar la multiresistencia a drogas.

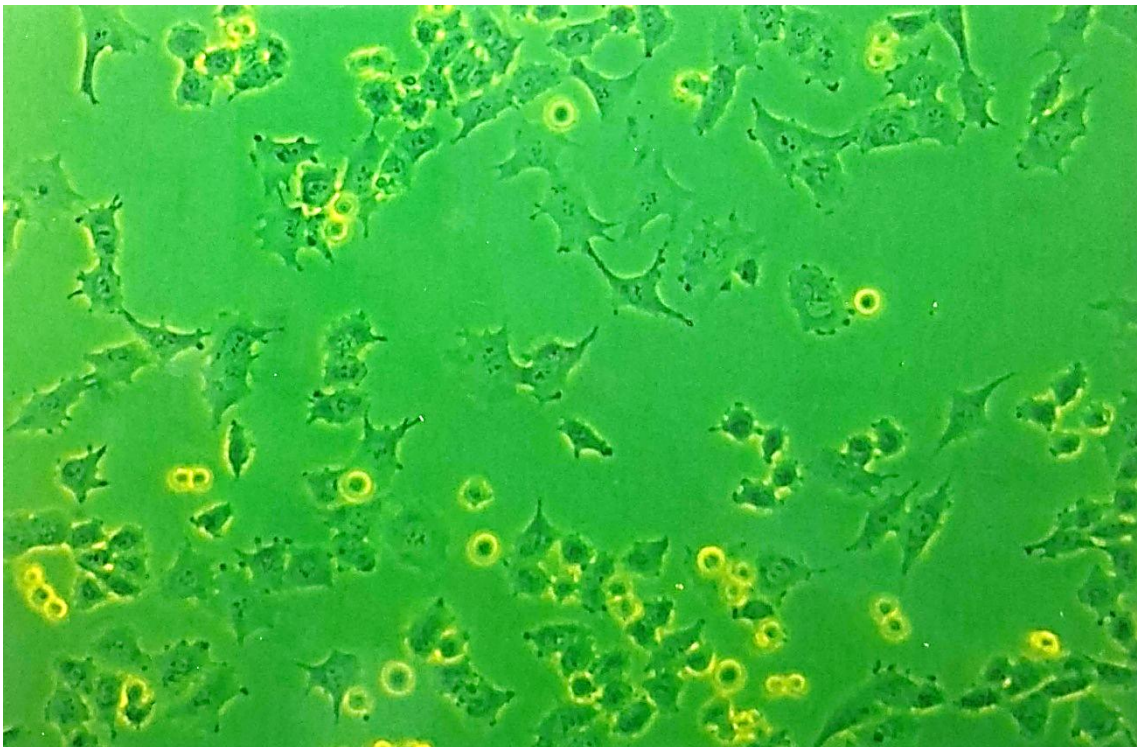
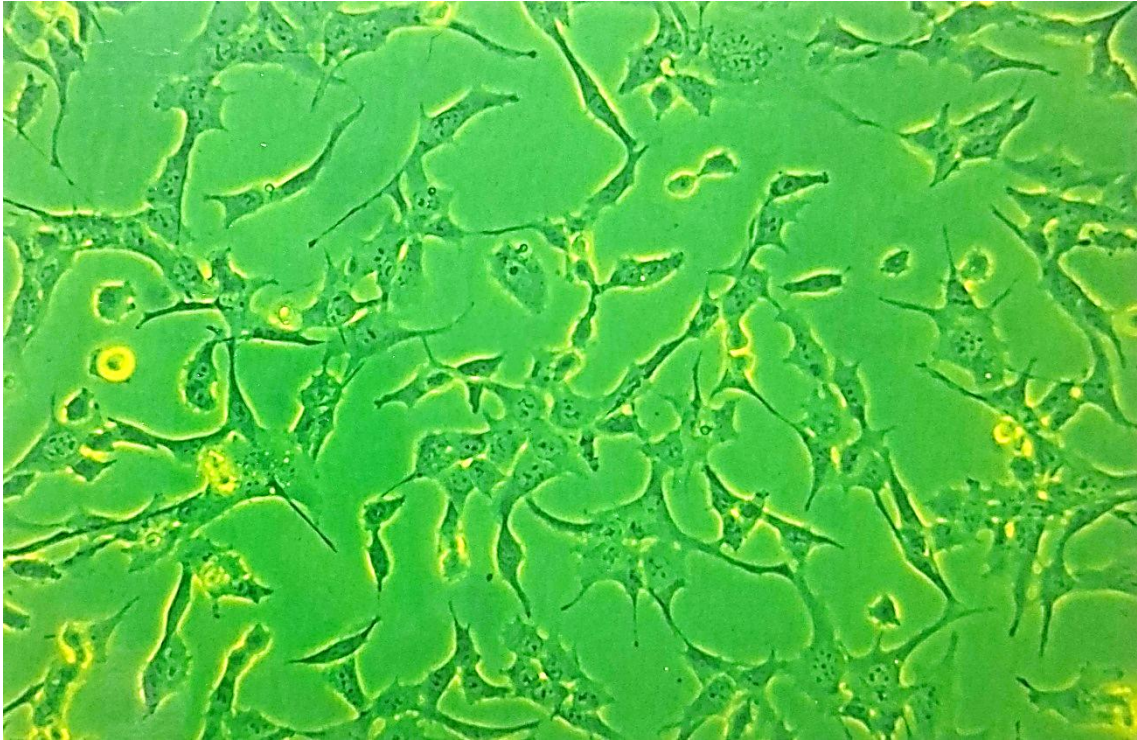


Figura IV.2.- Microscopía óptica de contraste de fases de ambas poblaciones celulares. En estas imágenes se puede apreciar la forma más redondeada y con menos anclajes de la sublínea celular seleccionada

Arriba: Línea parental de adenocarcinoma de colon humano (HCA) (200 X).

Abajo: Sublínea celular de adenocarcinoma de colon humano seleccionada con colchicina (1 $\mu\text{g/ml}$) (HCA-2/1^{CCH}) (200 X).

IV.2.- RESISTENCIA A COLCHICINA DE LA SUBLÍNEA CELULAR SELECCIONADA.

Con objeto de estudiar la resistencia obtenida tras la selección, se ensayó la respuesta de ambas líneas celulares frente a colchicina; obteniéndose así las curvas dosis-respuesta representadas en la figura IV.3. Cada punto representa la media de tres experimentos, realizados cada uno por triplicado.

El valor de ID_{50} indicativo de la dosis de droga a la que la fracción superviviente se reduce al 50 % de la fracción inicial, se utilizó para comparar la resistencia a colchicina de las dos líneas celulares (*Komiyama et al., 1989*). La línea parental (HCA) dio un valor de ID_{50} de 0,44 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para la sublínea resistente (HCA-2/1^{CCH}) el valor obtenido fue 1,467 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$ según el test t-Student. La resistencia relativa fue 3,32. Este valor es la relación entre la ID_{50} obtenida para la sublínea celular resistente respecto a la ID_{50} de la línea parental (*Kartner et al., 1983a; Kartner et al., 1983b; Twentyman et al., 1990a; Twentyman et al., 1990b*).

El mayor valor obtenido de ID_{50} así como la mayor supervivencia que presentan las células seleccionadas ($p < 0,05$, ANOVA-I) es indicativo de la mayor resistencia de ésta población a esta droga.

En la figura IV.4 se muestra una fotografía del resultado de un ensayo clonogénico realizado en placas petri. Cada célula sembrada que sobrevivió a las dosis de droga suministradas originó una colonia (puntos azules); las cuales pudieron ser contadas a simple vista. Los resultados se analizaron y compararon respecto al grupo control, que no recibió tratamiento. Se puede apreciar visualmente la disminución en la supervivencia celular (menor número de colonias) al aumentar la dosis de droga en ambas líneas celulares, así como la mayor supervivencia que presentó la sublínea resistente seleccionada (HCA-2/1^{CCH}).

En la figura IV.5 se muestra una fotografía del detalle de las colonias formadas por células de la sublínea seleccionada, cultivadas en medio líquido sobre una placa petri.

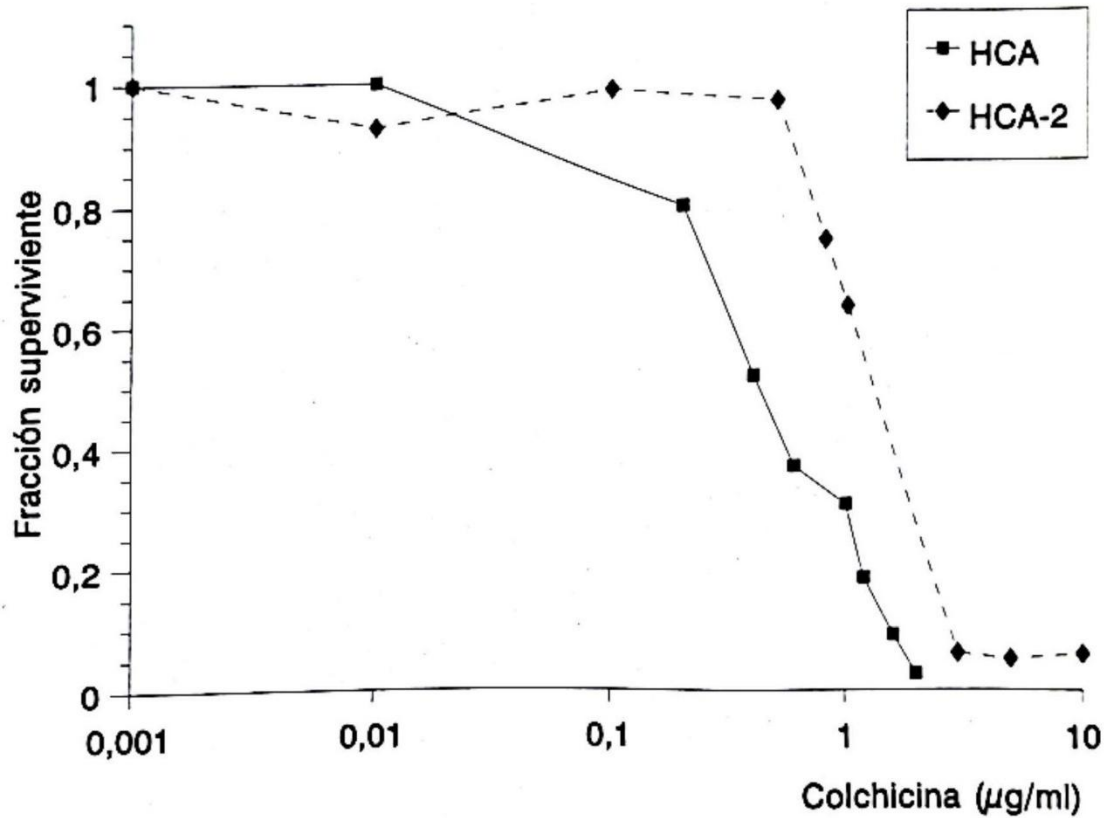


Figura IV.3.- Curvas dosis-respuesta frente a colchicina de las líneas celulares HCA y HCA-2/^{CCH}. El mayor valor obtenido de ID₅₀ así como la mayor supervivencia que presentan las células seleccionadas es indicativo de la mayor resistencia de ésta población a la droga. Cada punto representa la media de tres experimentos, realizados cada uno por triplicado. La fracción superviviente es la relación entre las eficiencias de planqueo del grupo tratado respecto al control. HCA: Adenocarcinoma de colon humano. CCH: Colchicina.

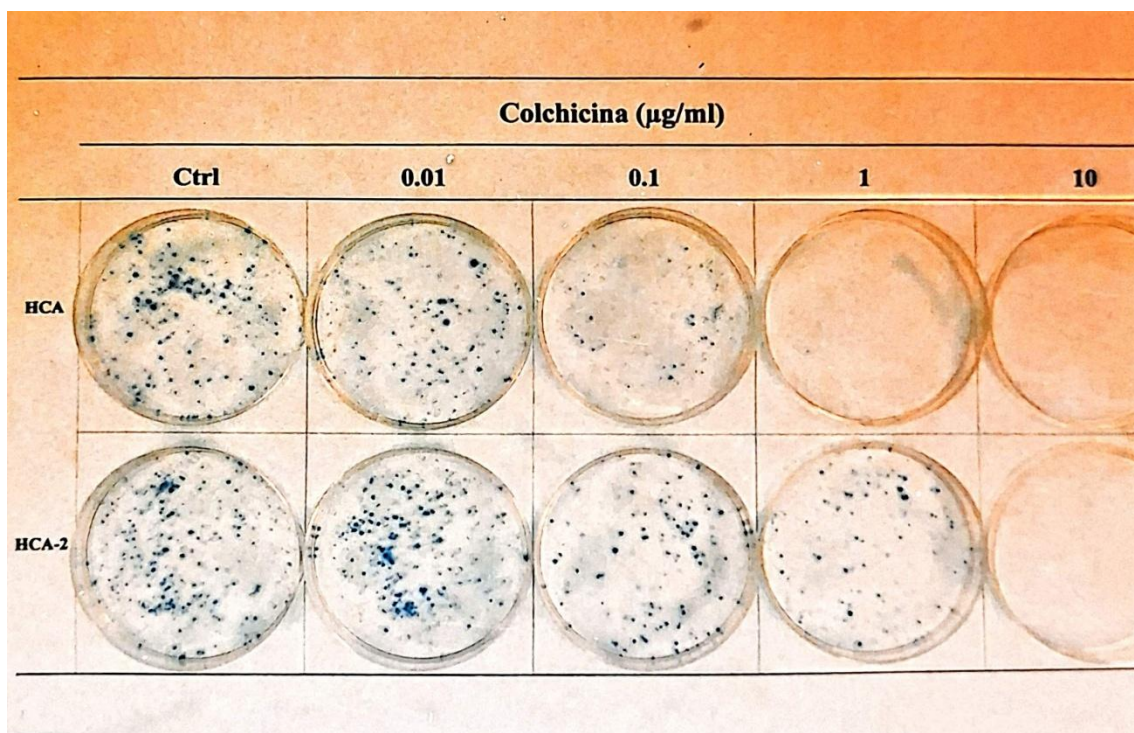


Figura IV.4.- Resultado de un ensayo clonogénico en monocapa realizado en placas petri. Las colonias crecidas fueron teñidas con azul de metileno (puntos azules). A medida que aumenta la dosis de droga el número de colonias supervivientes es menor; siendo la supervivencia obtenida para la subpoblación seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) mayor que para la población parental (HCA), a igual dosis de colchicina.

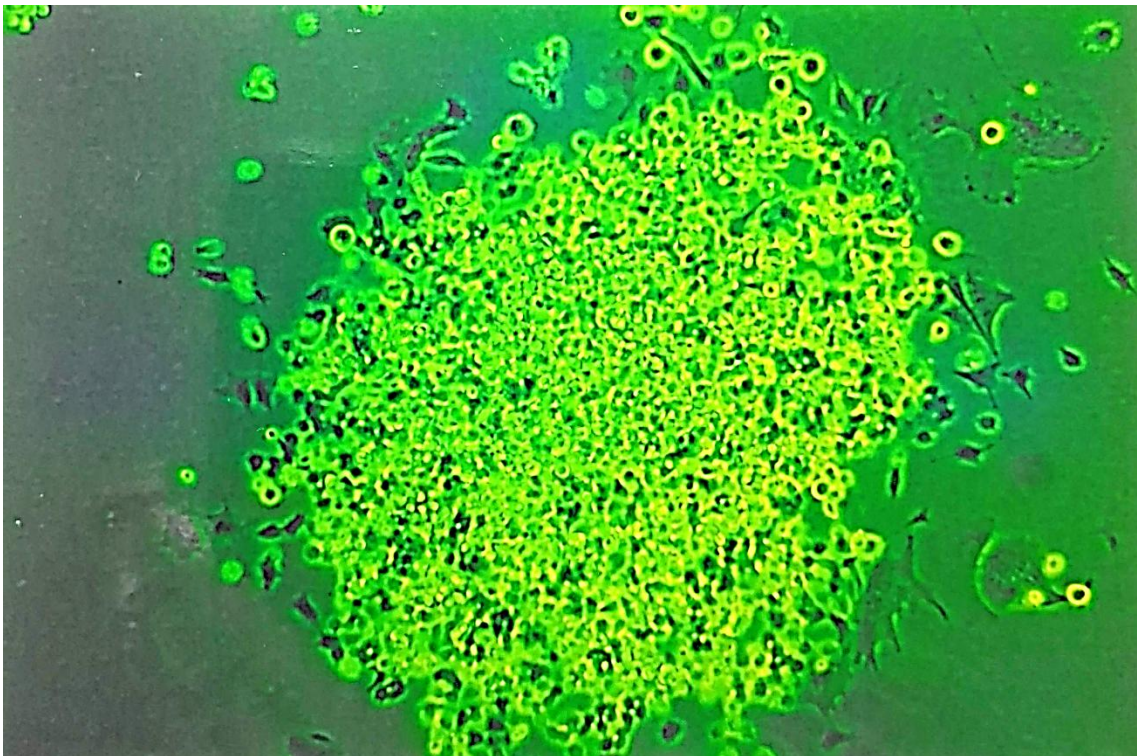
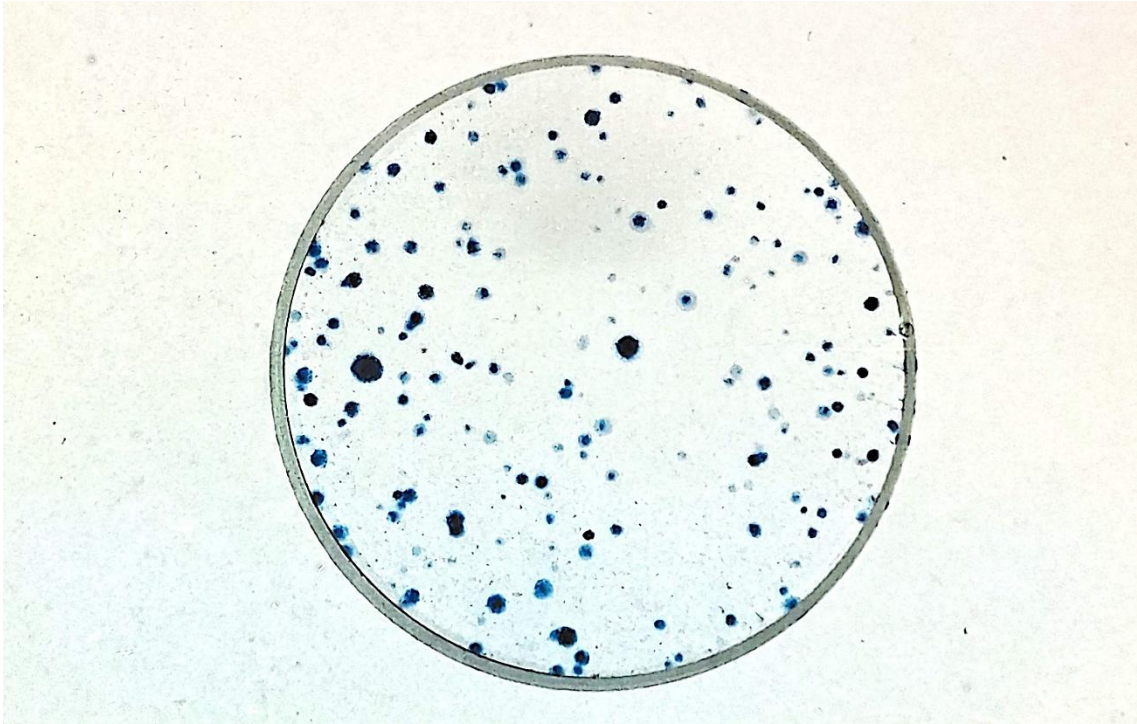


Figura IV.5.- Detalle de colonias, de adenocarcinoma de colon (HCA-2/1^{CCH}), crecidas sobre una placa petri. Cada colonia está formada por clones celulares originados a partir de una única célula.

Arriba: A simple vista.

Abajo: Detalle de una colonia al microscopio óptico de contraste de fases (100 X).

IV.3.- RESISTENCIA CRUZADA CON OTRAS DROGAS ANTINEOPLÁSICAS.

Con objeto de comprobar el fenómeno de resistencia a múltiples drogas, se procedió a ensayar la respuesta de la línea HCA-2/1^{CCH} a las drogas vinblastina (VBL), vincristina (VCR) y mitomicina C (MMC); no presentes en el medio de cultivo durante la selección. Para ello se realizaron ensayos clonogénicos, exponiendo las células a dosis crecientes de las drogas por espacio de 1 hora.

La citotoxicidad de las drogas se calculó como la relación entre el % de supervivencia del cultivo tratado con el agente antineoplásico respecto a la supervivencia obtenida en los controles no tratados. El resultado se expresó como fracción superviviente, extrapolándose a partir de estos datos el valor de ID₅₀, mediante regresión lineal (*Boiocchi y Toffoli, 1992*).

IV.3.1.- Dosis inhibitoria 50 % (ID₅₀).

El valor de ID₅₀ indicativo de la dosis de droga a la que la fracción superviviente se reduce al 50 % de la fracción inicial, se utilizó para comparar la resistencia a las drogas antineoplásicas tanto de la línea parental de adenocarcinoma de colon (HCA) como de la sublínea seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) (*Komiyama et al., 1989; Kartner et al., 1983b*).

En la tabla IV.1 se sumarian los valores de ID₅₀ que se obtuvieron para ambas líneas celulares. La línea parental (HCA) presentó para la droga con la que se realizó la selección (colchicina) un valor de ID₅₀ de 0,44 µg/ml. Los valores que se obtuvieron para las otras drogas fueron 1,036 µg/ml para vinblastina; 5,985 µg/ml para vincristina y 0,534 µg/ml para mitomicina C. Todos estos valores se usaron como referencia a la hora de comprobar si realmente la subpoblación seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) presentó un aumento en la resistencia cruzada con estas otras drogas.

La subpoblación celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) presentó resistencia cruzada con las otras drogas ensayadas. Se obtuvieron valores de ID₅₀ mucho más altos que los obtenidos para la línea parental (HCA). Así, la ID₅₀ para vinblastina fue 3,259 µg/ml; para vincristina 15,679 µg/ml; para mitomicina C 2,789 µg/ml y para colchicina 1,467 µg/ml. Cabe destacar el hecho de que el valor de ID₅₀ más elevado fue para vincristina.

El incremento obtenido de ID₅₀ entre ambas poblaciones, (HCA y HCA-2/1^{CCH}) (tabla IV.1), fue estadísticamente significativo según el test t-Student; p<0,001 para colchicina, vinblastina y mitomicina C; y p<0,005 para vincristina.

Tabla IV.1.- Resistencia cruzada y resistencia relativa de ambas poblaciones celulares. El valor de resistencia relativa representa la tasa de incremento de ID₅₀ observada para la línea resistente respecto a la que presenta la línea parental sensible.

| Droga | ID ₅₀ (µg/ml) | | Resistencia relativa | Valor P ^(**) |
|------------|--------------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| | HCA | HCA-2/1 ^{CCH} | | |
| CCH | 0,44 | 1,467 | 3,32 | < 0,001 |
| VBL | 1,036 ^(*) | 3,259 | 3,15 | < 0,001 |
| VCR | 5,985 ^(*) | 15,679 | 2,62 | < 0,005 |
| MMC | 0,534 ^(*) | 2,789 | 5,22 | < 0,001 |

(*) Este dato pertenece a los trabajos de investigación conducentes a la Tesis Doctoral de D. José A. Morales Moreno, que muy generosamente lo ha cedido para poder realizar las comparaciones.

(**) Según el test t-Student.

ID₅₀: Dosis de droga a la cual la fracción superviviente se reduce al 50 % de la fracción inicial.

HCA: Línea parental de adenocarcinoma de colon humano.

HCA-2/1^{CCH}: Sublínea de adenocarcinoma de colon seleccionada con colchicina.

CCH: Colchicina. VBL: Vinblastina. VCR: Vincristina. MMC: Mitomicina C.

IV.3.2.- Resistencia relativa.

El nivel de resistencia relativa de una línea celular para un agente quimioterapéutico mide la capacidad de la línea para sobrevivir y proliferar en presencia del agente citotóxico presente en el medio de cultivo (*LaQuaglia et al., 1991*).

La resistencia relativa es un valor que representa la tasa de incremento de ID₅₀ que experimenta la sublínea celular resistente (HCA-2/1^{CCH}) respecto de la ID₅₀ de la línea parental (HCA) de la que fue seleccionada; y que se usa como control para una droga dada. Este parámetro se calculó según la expresión (*Twentyman et al., 1990a; Kartner et al., 1983b; Twentyman et al., 1990b*):

$$\text{Resistencia relativa} = \frac{ID_{50} \text{ (Sublínea resistente)}}{ID_{50} \text{ (Línea parental)}}$$

La resistencia relativa que se obtuvo para la droga presente en la selección (colchicina) fue 3,32 (tabla IV.1). Para el resto de las drogas se obtuvieron valores más bajos (3,15 para vinblastina y 2,62 para vincristina); excepto para la mitomicina C que dio un valor de 5,22. La mitomicina C presentó un valor mucho mayor que el obtenido para la droga con la que se realizó la selección (tabla IV.1).

IV.4.- EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P.

Para comprobar si realmente las células seleccionadas presentaban Gp-P, se realizaron en primer lugar tinciones para microscopía óptica y posteriormente se analizaron los niveles de Gp-P mediante citometría de flujo.

IV.4.1.- Microscopía óptica.

En la figura IV.6 se expone una fotografía, tomada a microscopio óptico, de la sublínea celular HCA-2/1^{CCH} teñida con una tinción inmunocitoquímica específica para Gp-P. Esta tinción se realizó con el anticuerpo monoclonal JSB-1 y fue revelada con un 2º anticuerpo con actividad fosfatasa. Como solución de contraste se utilizó hematoxilina, tiñéndose los núcleos de color azul. En la fotografía se ve claramente que la tinción para el anticuerpo usado fue positiva. Las células aparecen repletas de puntitos rojos, indicativos de la presencia de Gp-P en las membranas celulares.

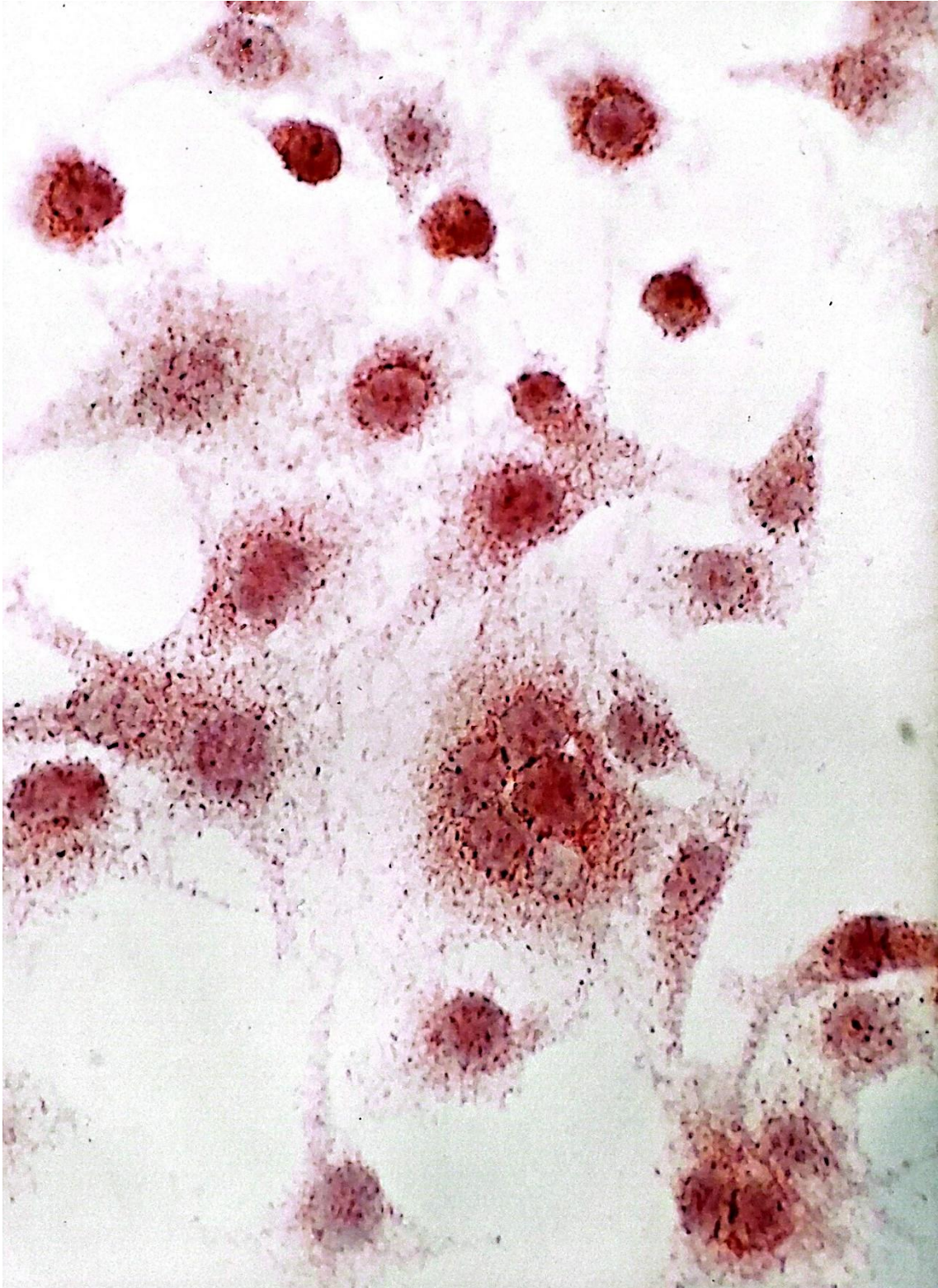


Figura IV.6.- Tinción inmunocitoquímica contra la glicoproteína-P en células HCA-2/1^{CCH} cultivadas in vitro (450 X).

Fue realizada con el anticuerpo monoclonal JSB-1 y revelada con un 2º anticuerpo con actividad fosfatasa. Donde la tinción es positiva aparecen puntos rojos, por lo que estas células presentan Gp-P en las membranas celulares. Los núcleos aparecen de color azul, debido al contraste con hematoxilina.

IV.4.2.- Citometría de flujo.

Para determinar los niveles de Gp-P se realizó una doble tinción; por un lado con un anticuerpo marcado con FITC contra el anticuerpo JSB-1, específico para Gp-P, y por otro lado con IP para ADN.

Contenido en glicoproteína-P de la sublínea celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH}).

Tanto la línea parental (HCA) como la sublínea seleccionada expresaron Gp-P; como es normal en colon. En la figura IV.7 se representa el contenido en Gp-P de ambas líneas celulares.

En el eje X se representan los canales de fluorescencia para el anticuerpo marcado con FITC (FL1), o sea, contenido en Gp-P y en el eje Y se representa el número de eventos.

El ruido de fondo se eliminó mediante un "gate" ajustado gracias a los controles realizados. En la figura IV.7 se observa cómo el histograma de la subpoblación seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) se desplaza hacia un aumento de la fluorescencia (FL1). Por lo que la población celular HCA-2/1^{CCH} presentó mayores niveles de Gp-P que la línea parental (HCA).

Comparando los resultados estadísticos que nos suministró el citómetro de flujo se comprobó que el contenido medio en Gp-P (el cual viene dado por el canal medio de fluorescencia; FL1, eje X) aumentó desde el canal 61,72 para HCA hasta el canal 98,17 para HCA-2/1^{CCH} ($p < 0,05$; t-Student) (fig. IV.7) (tabla IV.2).

De igual manera, el canal de fluorescencia correspondiente al pico máximo aumentó desde la canal 33,37 (para HCA) hasta el 78,43 (para HCA-2/1^{CCH}) ($p < 0,005$; t-Student) (fig. IV.7) (tabla IV.2).

En la figura IV.7 se representan los histogramas que se obtuvieron para ambas poblaciones celulares. La subpoblación HCA-2/1^{CCH} presentó el pico máximo del histograma en un canal de fluorescencia mayor que la población parental.

El desplazamiento del canal de fluorescencia correspondiente al pico máximo del histograma, hacia un canal de fluorescencia mayor; es indicativo del mayor contenido en Gp-P de la subpoblación seleccionada. La sublínea HCA-2/1^{CCH} presentó 2,35 veces más Gp-P que la línea parental (HCA) (tabla IV.2).

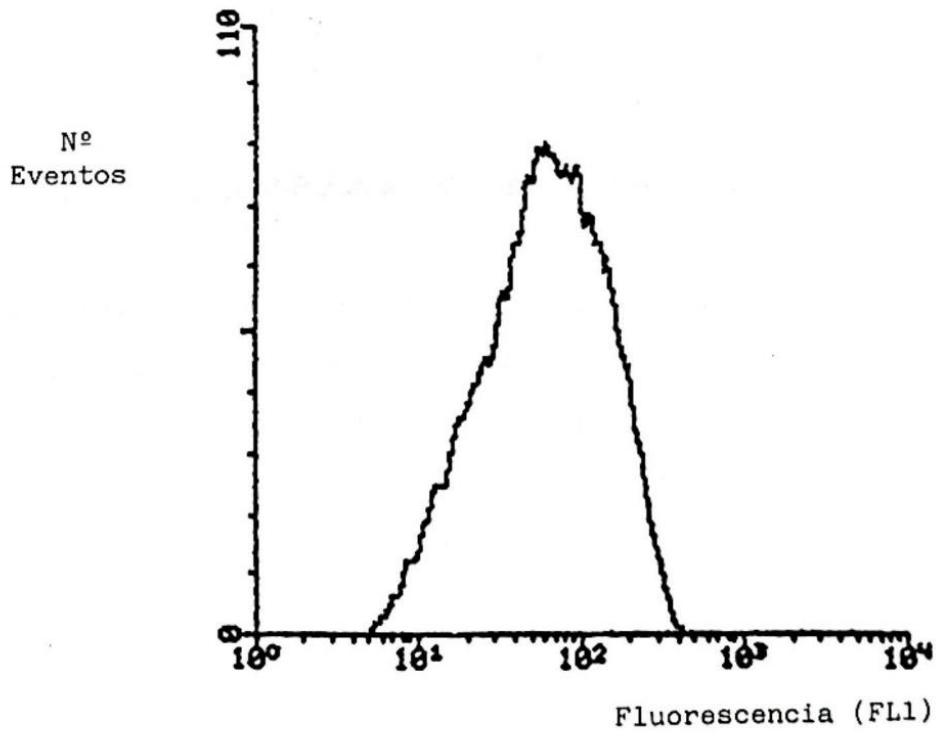
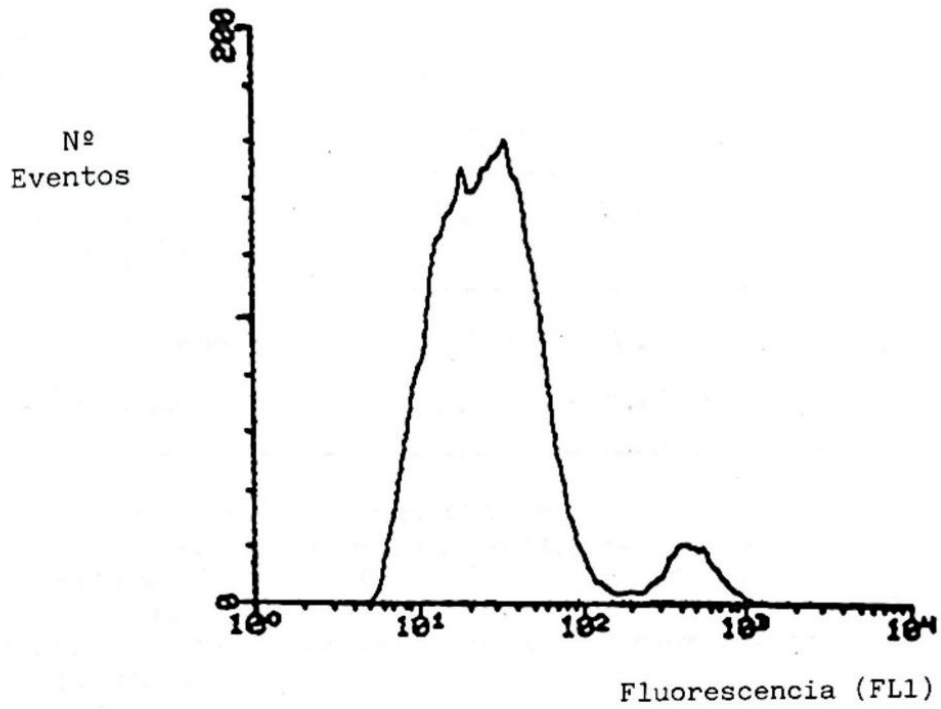


Figura IV.7.- Contenido en glicoproteína-P de la población parental (HCA) (Arriba) y de la subpoblación seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) (Abajo).

Se representa el número de eventos frente a los canales de fluorescencia. Se observa un desplazamiento del pico máximo hacia un canal de fluorescencia mayor; indicativo del mayor contenido en Gp-P de la subpoblación seleccionada (HCA-2/1^{CCH}).

FL1: Fluorescencia debida al FITC; indicativo del contenido en Gp-P.

Tabla IV.2.- Contenido en glicoproteína-P de ambas líneas celulares.

| Canal de fluorescencia (Gp-P) | Línea celular | | Valor P ^(*) |
|----------------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| | HCA | HCA-2/1 ^{CCH} | |
| Pico máximo | 33,37 | 78,43 (2,35) | < 0,005 |
| Canal medio | 61,72 | 98,17 (1,59) | < 0,05 |

HCA: Línea parental de adenocarcinoma de colon humano.

HCA-2/1^{CCH}: Sublínea de adenocarcinoma de colon seleccionada con colchicina.

Gp-P: Glicoproteína-P. Pico máximo: Canal de fluorescencia del pico máximo. Canal medio: Canal medio de fluorescencia.

Entre paréntesis se expone el incremento obtenido respecto a la línea parental.

(*) Según el test t-Student.

Contenido en glicoproteína-P durante el proceso de selección.

Se procedió a estudiar el contenido en Gp-P durante todo el proceso de selección, recogiendo muestras a intervalos de tiempo; para comprobar cuándo y de qué forma se podría producir un aumento en los niveles de esta proteína. Se analizaron muestras a los 0, 26, 53, 74 y 82 días de exposición a la droga. Los días 0 y 82 corresponden a las poblaciones HCA y HCA-2/1^{CCH}, respectivamente.

En la figura IV.8 se expone el resultado obtenido, representando los canales de fluorescencia de los histogramas frente al tiempo de selección en días. Se aprecia cómo se produjeron pequeñas variaciones en cuanto al canal de fluorescencia del pico máximo hasta el día 74, no siendo dichas diferencias significativas ($p > 0,05$; ANOVA-I, t-Student). Sin embargo, es en el último paso de selección (74-82 días) cuando se produjo un incremento considerable en el desplazamiento del pico máximo hacia canales de fluorescencia mayores ($p < 0,05$, t-Student; respecto al punto anterior (74 días) y $p < 0,005$, t-Student; respecto al punto inicial (0 días)).

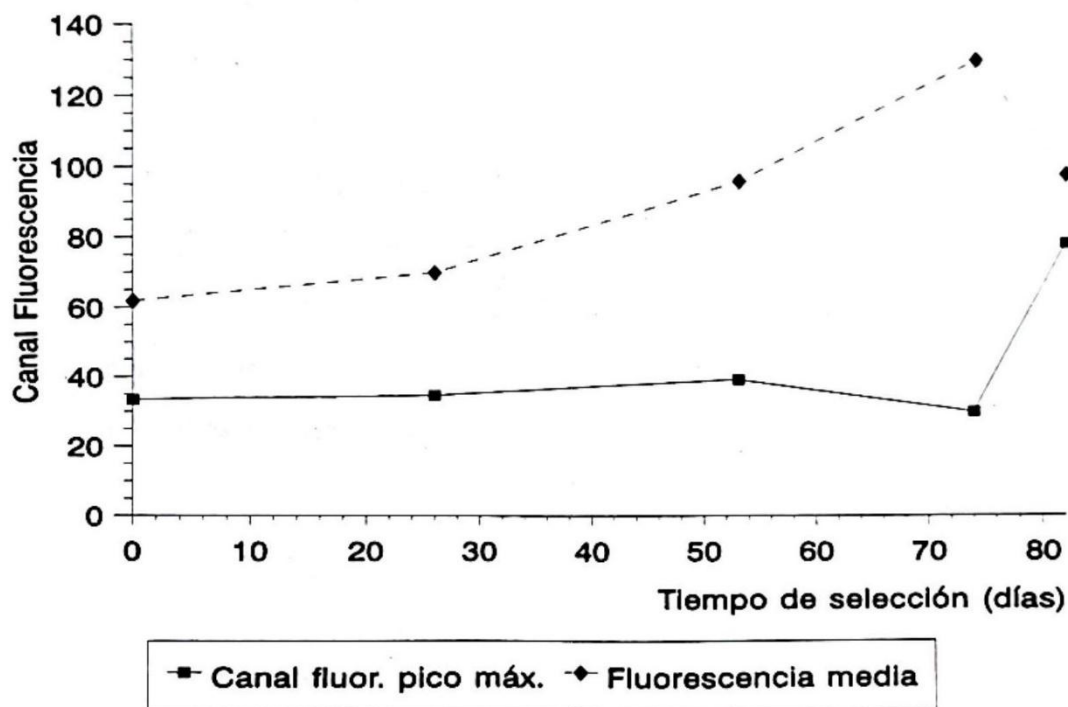


Figura IV.8.- Evolución del contenido en glicoproteína-P a lo largo del proceso de selección. Día 0: Línea parental de adenocarcinoma de colon (HCA). Día 82: Sublínea seleccionada de adenocarcinoma de colon (HCA-2/1^{CCH}).

Por otro lado, el canal de fluorescencia medio que se obtuvo para los histogramas sufrió una variación diferente en el proceso de selección (fig. IV.8). La fluorescencia media de los histogramas aumentó progresivamente hasta el día 74 y posteriormente se produjo un descenso hasta el día 82. Las diferencias que se observaron a lo largo de esta curva son significativas según el análisis ANOVA-I, $p < 0,05$.

El incremento de fluorescencia media que se obtuvo para la sublínea HCA-2/1^{CCH}, respecto a la población parental (HCA), es estadísticamente significativo ($p < 0,05$; t-Student).

En la figura IV.9 se representa la evolución de los histogramas durante la selección. El segundo pico que apareció, pudo ser debido a que una pequeña parte de la población parental podría haber presentado mayores niveles de Gp-P en sus membranas y por lo tanto haber sido más resistente que el resto. Durante la selección se produjo un aumento en altura de este segundo pico (fig. IV.9) (días 53-74) que se puso de manifiesto además, por el aumento de fluorescencia media (fig. IV.8) (días 26-74). Fue tras la exposición a una dosis de colchicina mayor (1 $\mu\text{g/ml}$) (día 74) y el picado de clones (día 82), cuando se desplazó el primer pico hacia un canal de fluorescencia mayor (mayor nivel de Gp-P y por tanto mayor resistencia) y desapareció el segundo pico minoritario (fig. IV.8 y IV.9).

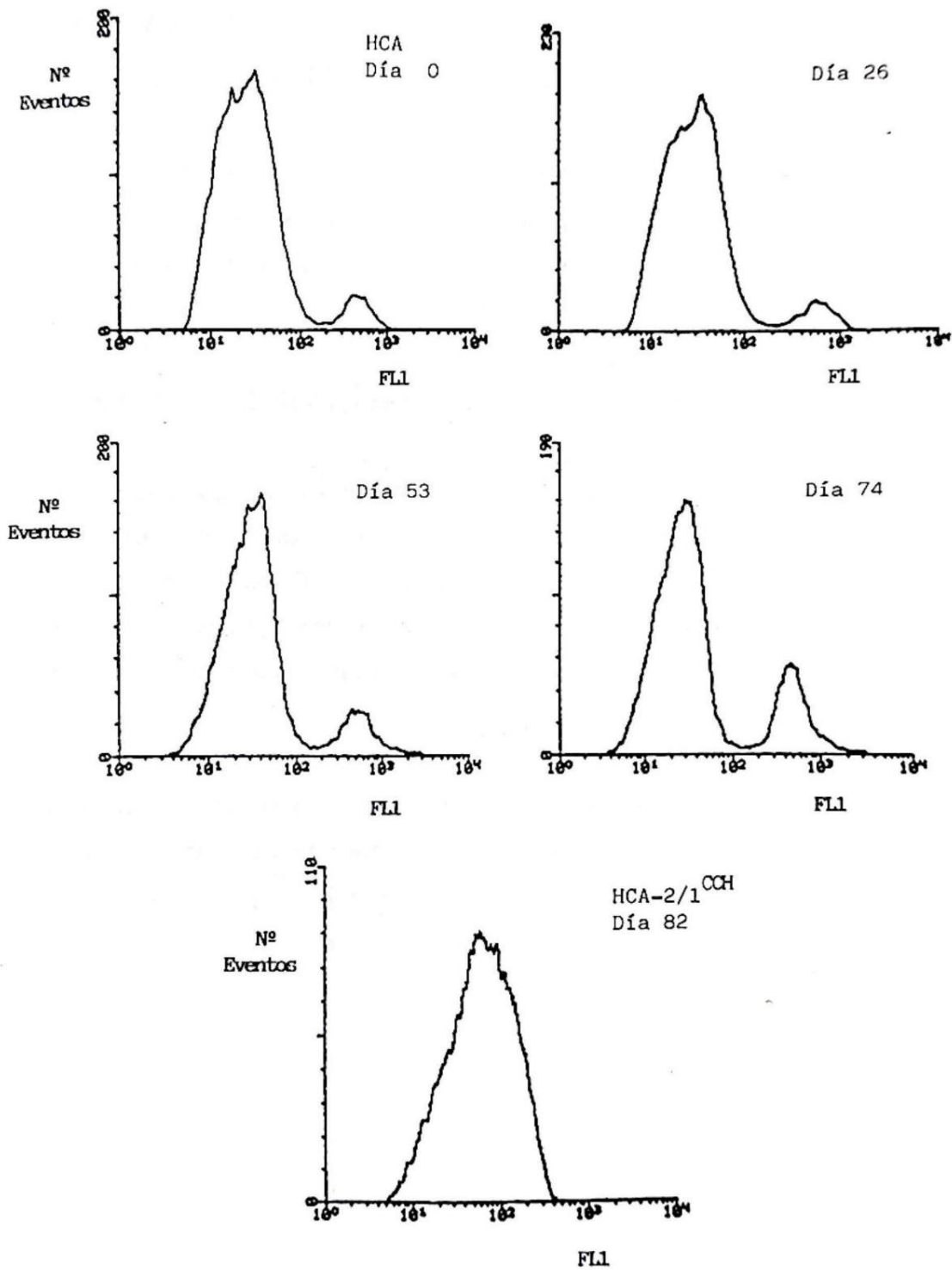


Figura IV.9.- Histogramas del contenido en glicoproteína-P durante el proceso de selección. Se representa el número de eventos frente a los canales de fluorescencia (FL1).
 FL1: Fluorescencia debida al anticuerpo marcado con FITC.
 HCA: Línea parental de adenocarcinoma de colon (día 0).
 HCA-2/1^{CCH}: Sublínea de adenocarcinoma de colon seleccionada con colchicina (día 82).

IV.5.-EFECTO DEL VERAPAMIL SOBRE LA REVERSIÓN DE RESISTENCIA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS.

El verapamil (VRP) se ha utilizado, en gran número de líneas celulares, como revertiente del fenómeno de resistencia a múltiples drogas. La reversión mediante verapamil constituye una característica más del fenotipo MDR.

IV.5.1.- Curvas dosis-respuesta.

Se procedió a ensayar la respuesta de la subpoblación seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) a las drogas colchicina, vinblastina, vincristina y mitomicina C en presencia de verapamil (10 µg/ml) (Komiyama *et al.*, 1989). El estudio se realizó mediante ensayo clonogénico y los resultados se compararon con los obtenidos para la misma población celular y drogas, en ausencia de verapamil.

Se obtuvieron ocho curvas dosis-respuesta (fig. IV.10, IV.11, IV.12 y IV.13); donde se representaron la fracción superviviente frente a las concentraciones de droga ensayadas para cada caso. Cada punto representa la media de tres experimentos realizados cada uno por triplicado. Los datos se compararon utilizando controles sin droga, en ausencia y en presencia de verapamil.

Para la droga presente durante la selección (colchicina) se obtuvo una gran reversión de la resistencia al añadir verapamil al medio de cultivo (fig. IV.10). Se obtuvo una curva marcadamente muy por debajo de la obtenida sin verapamil. Las diferencias entre ambas curvas fueron significativas desde 0,1 µg/ml ($p < 0,01$; t-Student) hasta 3 µg/ml de colchicina ($p < 0,05$; t-Student). Los valores de significación más altos que se alcanzaron en ese rango, oscilaron entre $p < 0,005$ y $p < 0,001$ (t-Student). Las diferencias que se observaron para ambas curvas fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA-I).

El resto de drogas ensayadas (VBL, VCR y MMC) mostraron resultados similares. Para vinblastina (fig. IV.11) no se obtuvo un resultado tan marcado, aunque sí hubo reversión de la resistencia. Al añadir verapamil se obtuvieron valores significativos desde 3

$\mu\text{g/ml}$ ($p<0,01$; t-Student) hasta $8 \mu\text{g/ml}$ de vinblastina ($p<0,01$; t-Student). El resto de puntos de la curva no presentaron diferencias significativas respecto a la curva de referencia. Cabe destacar la franja localizada desde $0,001$ hasta $1 \mu\text{g/ml}$ de vinblastina, donde la curva tratada con verapamil se sitúa por encima de la no tratada. Esto podría ser debido a la desviación estándar que se obtuvo en los resultados.

En la curva obtenida para vincristina (fig. IV.12) se puede observar cómo al añadir verapamil la resistencia de la población celular disminuye. Las diferencias entre ambas curvas fueron significativas para el rango de dosis de droga comprendido entre 1 y $30 \mu\text{g/ml}$ ($p<0,05$; t-Student). El máximo valor de significación que se obtuvo, en ese rango de concentración de droga, fue de $p<0,001$ (para $10 \mu\text{g/ml}$ de vincristina), según el test t-Student.

Para mitomicina C (fig. IV.13) también se obtuvieron unos resultados positivos en cuanto a reversión por verapamil se refiere. La resistencia de la población celular disminuyó al añadir verapamil al medio ($p<0,05$; ANOVA-I). Estas diferencias se hicieron significativas para dosis de mitomicina C desde $0,4 \mu\text{g/ml}$ ($p<0,01$; t-Student) hasta $3 \mu\text{g/ml}$ ($p<0,05$; t-Student); siendo la mayor significación, en ese rango de concentraciones, de $p<0,005$ (t-Student) para $2 \mu\text{g/ml}$ de droga. En la figura IV.13 se puede observar claramente cómo la fracción superviviente, obtenida para esta droga, desciende brusca y paralelamente en ambas curvas, a partir de $1,5 \mu\text{g/ml}$.

Cabe destacar el hecho de que para colchicina y mitomicina C el rango de concentración, entre el cual se obtuvo reversión de resistencia, osciló entre $0,1$ y $3 \mu\text{g/ml}$ (tabla IV.3). Sin embargo, para las otras drogas (vinblastina y vincristina) este rango se desplazó hacia dosis mayores. El valor mínimo que se obtuvo osciló entre 1 y $3 \mu\text{g/ml}$ y el máximo entre 8 y $30 \mu\text{g/ml}$ (tabla IV.3).

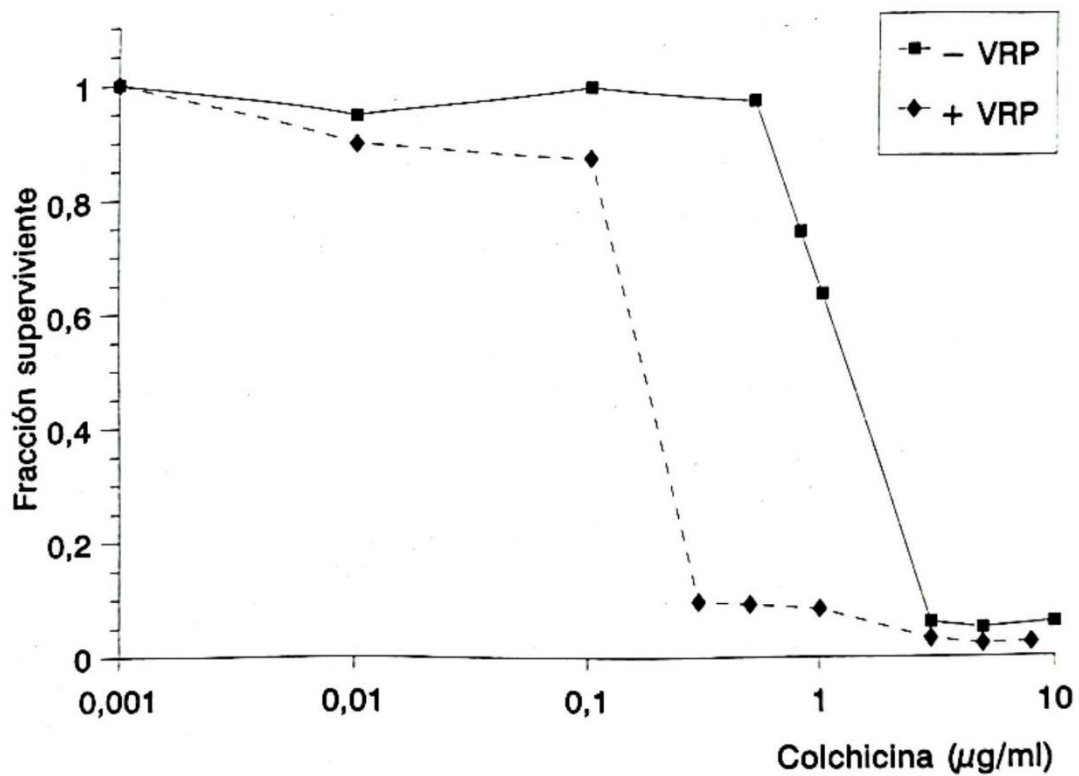


Figura IV.10.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a colchicina en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Cada punto representa la media de tres experimentos realizados cada uno por triplicado.

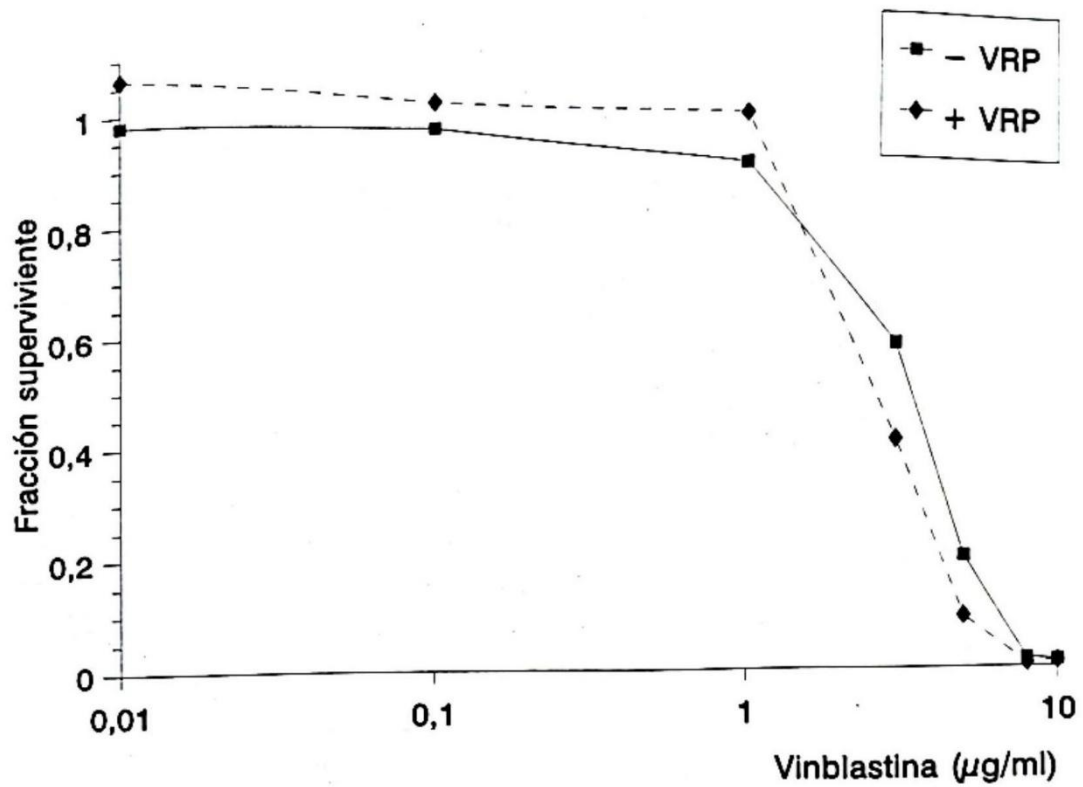


Figura IV.11.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a vinblastina en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Cada punto representa la media de tres experimentos realizados cada uno por triplicado.

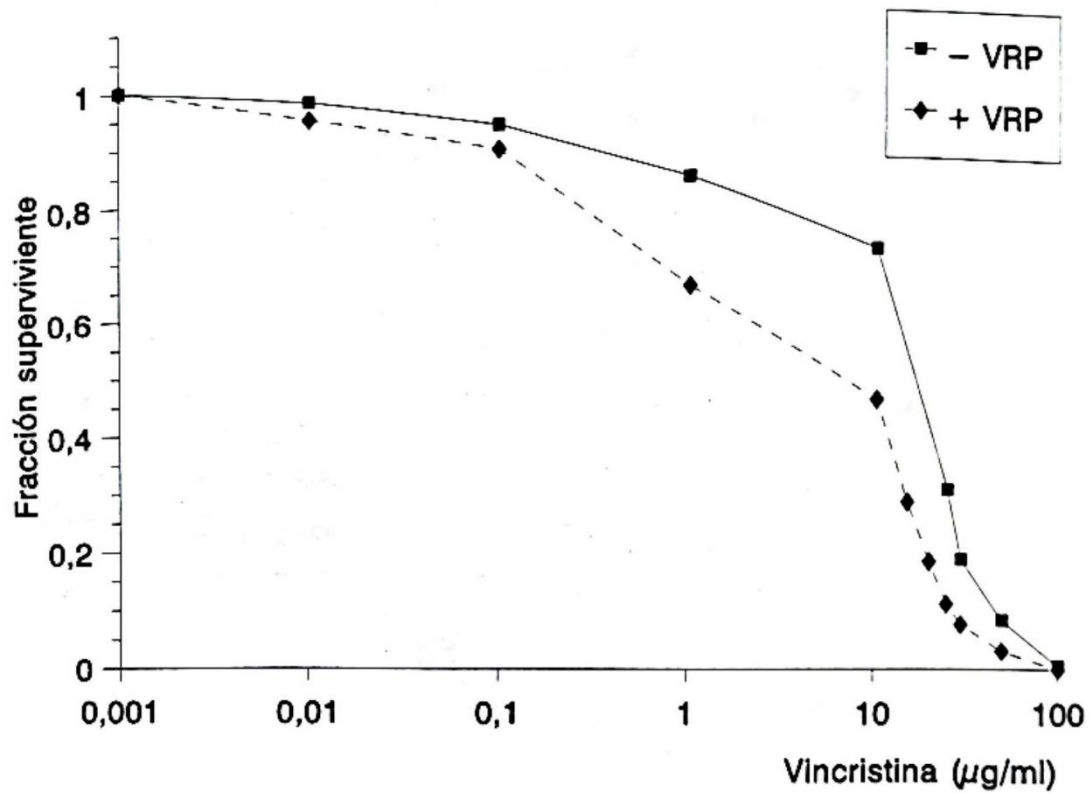


Figura IV.12.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a vincristina en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Cada punto representa la media de tres experimentos realizados cada uno por triplicado.

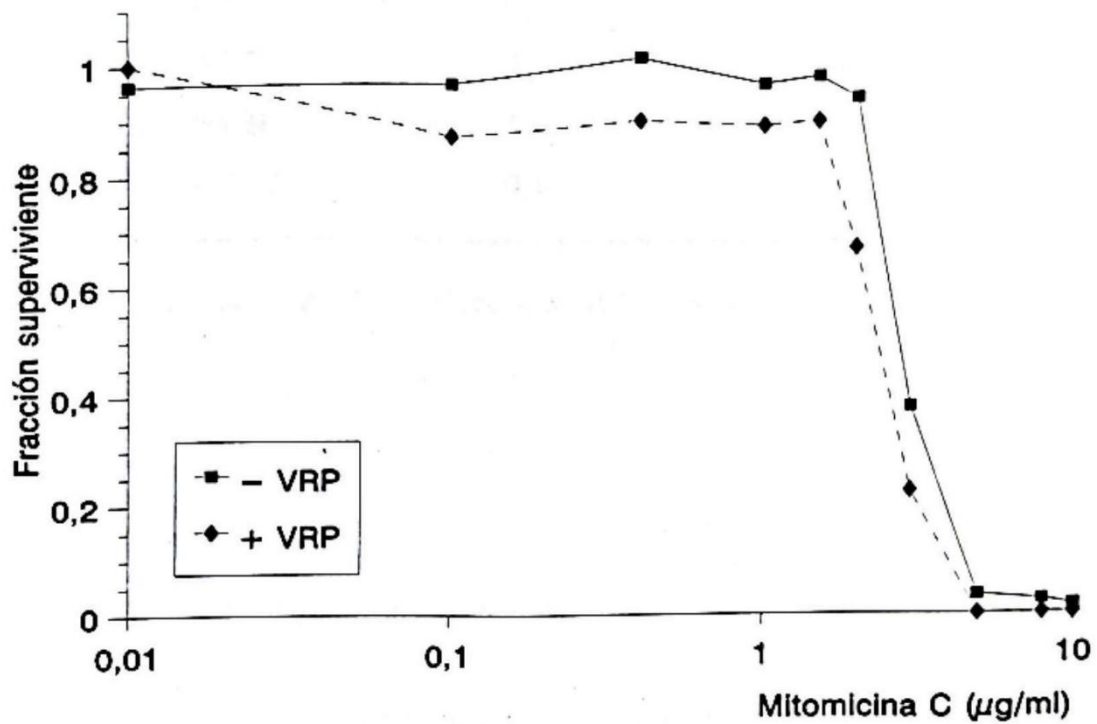


Figura IV.13.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia a mitomicina C en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Cada punto representa la media de tres experimentos realizados cada uno por triplicado.

Tabla IV.3.- Intervalos significativos de reversión de resistencia.
Rango de dosis de drogas entre los cuales se obtuvo reversión significativa de resistencia mediante el uso de verapamil (10 µg/ml), sobre la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

| Droga | Dosis de reversión (µg/ml) HCA-2/1 ^{CCH} | |
|-------|--|--------|
| | Mínima | Máxima |
| CCH | 0,1 | 3 |
| VBL | 3 | 8 |
| VCR | 1 | 30 |
| MMC | 0,4 | 3 |

CCH: Colchicina. VBL: Vinblastina. VCR: Vincristina. MMC: Mitomicina C.

IV.5.2.- Dosis inhibitoria 50 % (ID₅₀).

El valor de ID₅₀ indicativo de la dosis de droga a la que la fracción superviviente se reduce al 50 % de la fracción inicial, se utilizó para comparar el efecto del verapamil sobre la reversión de la resistencia a múltiples drogas en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Los valores de ID₅₀ fueron extrapolados mediante regresión lineal a partir de las fracciones supervivientes obtenidas para cada droga (*Boiocchi y Toffoli, 1992*).

En la tabla IV.4 se puede observar cómo al añadir verapamil (10 µg/ml) junto con la droga, disminuyó el valor de ID₅₀. Para todas las drogas ensayadas (CCH, VBL, VCR y MMC) se revirtió la resistencia.

El valor de ID₅₀ para colchicina descendió desde 1,467 µg/ml hasta 0,198 µg/ml al añadir verapamil; $p < 0,005$ según el test t-Student.

Para el resto de las drogas la disminución no fue tan patente. Así, para vinblastina el valor descendió desde 3,259 µg/ml a 2,598 µg/ml, ($p < 0,001$; t-Student); para vincristina

disminuyó desde 15,679 $\mu\text{g/ml}$ hasta 6,654 $\mu\text{g/ml}$, ($p < 0,001$; t-Student); y por último para mitomicina C descendió desde 2,789 $\mu\text{g/ml}$ a 2,377 $\mu\text{g/ml}$, ($p < 0,001$; t-Student).

Las diferencias fueron estadísticamente significativas para todas las drogas ensayadas.

Tabla IV.4.- Efecto del verapamil sobre la dosis ID_{50} y la reversión de resistencia a drogas en la sublínea celular seleccionada.

La tasa de sensibilización relativa es el grado de sensibilización que produce un agente revertidor de resistencia en una población celular y para una droga dada. Se calculó comparando el valor de ID_{50} obtenido en ausencia de verapamil respecto al obtenido en presencia del mismo.

| Droga | ID_{50} ($\mu\text{g/ml}$) HCA-2/1 ^{CCH} | | Tasa de sensibilización relativa | Valor P ^(*) |
|------------|---|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| | - VRP | + VRP (10 $\mu\text{g/ml}$) | | |
| CCH | 1,467 | 0,198 | 7,41 | < 0,005 |
| VBL | 3,259 | 2,598 | 1,25 | < 0,001 |
| VCR | 15,679 | 6,654 | 2,36 | < 0,001 |
| MMC | 2,789 | 2,377 | 1,17 | < 0,001 |

HCA-2/1^{CCH}: Sublínea celular de adenocarcinoma de colon seleccionada con colchicina.

ID_{50} : Dosis de droga a la cual la fracción superviviente se reduce al 50 % de la fracción inicial.

VRP: Verapamil. CCH: Colchicina. VBL: Vinblastina. VCR: Vincristina. MMC: Mitomicina C.

(*) Según el test t-Student.

IV.5.3.- Tasa de sensibilización relativa.

La tasa de sensibilización relativa es el grado de sensibilización que produce un agente revertidor de resistencia (verapamil en este caso) en una población celular (HCA-2/1^{CCH}) y para una droga dada. El valor obtenido representa la tasa de disminución de ID₅₀ que experimenta la población celular para una droga determinada cuando se somete conjuntamente al efecto del verapamil.

Este parámetro se calculó según la expresión (*Twentyman et al., 1990a, 1990b; Goodman et al., 1987*):

$$\text{Tasa de sensibilización} = \frac{\text{ID}_{50} \text{ en ausencia de verapamil}}{\text{ID}_{50} \text{ en presencia de verapamil}}$$

La mayor tasa de sensibilización relativa mediante verapamil (10 µg/ml), se obtuvo para la droga presente durante la selección de resistencia (colchicina); obteniéndose un valor de 7,41. Para el resto de drogas se obtuvieron valores mucho más bajos y homogéneos: 1,25 para vinblastina, 2,36 para vincristina y 1,17 para mitomicina C (tabla IV.4).

En la figura IV.14 se expone una fotografía de un ensayo clonogénico, donde se puede apreciar el efecto revertidor de resistencia del verapamil. Se puede observar un menor número de colonias en las placas a las que se añadió verapamil. Este hecho fue indicativo de la mayor mortalidad celular causada por la droga, la cual fue potenciada por el verapamil.

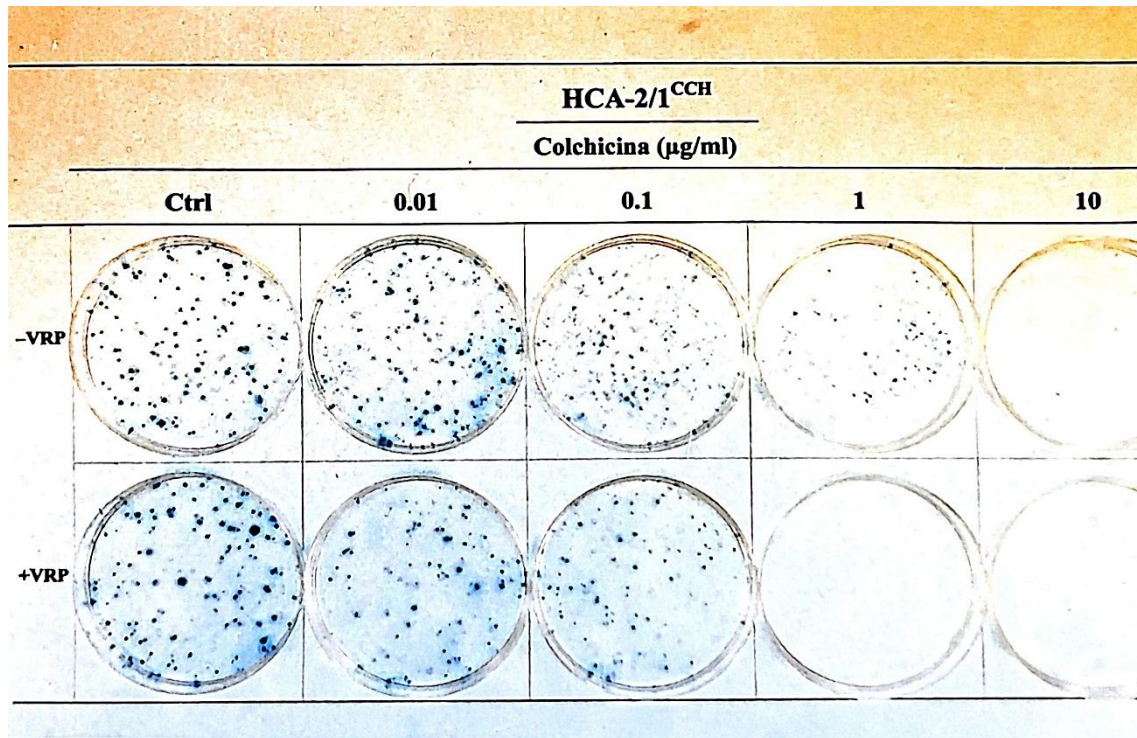


Figura IV.14.- Efecto del verapamil sobre la reversión de resistencia.
 En este ensayo clonogénico se puede apreciar cómo a las placas a las que se añadió verapamil (10 µg/ml) junto con la droga, se produjo una menor supervivencia celular. El verapamil potenció el efecto de la droga.

IV.5.4.- Incremento de dosis de verapamil.

Una vez que se comprobó que el verapamil revirtió la resistencia múltiple a las drogas antineoplásicas, se procedió a incrementar la dosis suministrada en los ensayos; con el fin de comprobar si el efecto sensibilizante también se vería incrementado. Se procedió a aumentar la dosis a niveles de 25 µg/ml, obteniéndose los siguientes resultados.

Se ensayó el efecto conjunto del verapamil (25 µg/ml) con las drogas colchicina, vinblastina, vincristina y mitomicina C a las concentraciones puntuales de: CCH (0,1 µg/ml), VBL (3 µg/ml), VCR (1 µg/ml) y MMC (2 µg/ml); ya que a esas dosis el posible efecto revertiente esperado podría ser puesto de manifiesto de una forma más patente.

Los resultados que se obtuvieron fueron comparados con los hallados tanto para dosis de 10 µg/ml de verapamil, como para ausencia del mismo. Se realizaron controles en ausencia de droga, conteniendo 25 µg/ml de verapamil. Cada punto representa la media de dos experimentos, realizados cada uno por duplicado.

Para la droga presente durante la selección (colchicina) y a una dosis de 0,1 µg/ml no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$, t-Student) respecto a los resultados obtenidos con 10 µg/ml de verapamil. El verapamil sí revirtió la resistencia a esta droga, tal y como se dedujo al comparar el resultado con el obtenido en ausencia del mismo y con el control; ($p < 0,05$; t-Student; en ambos casos) (fig. IV.15).

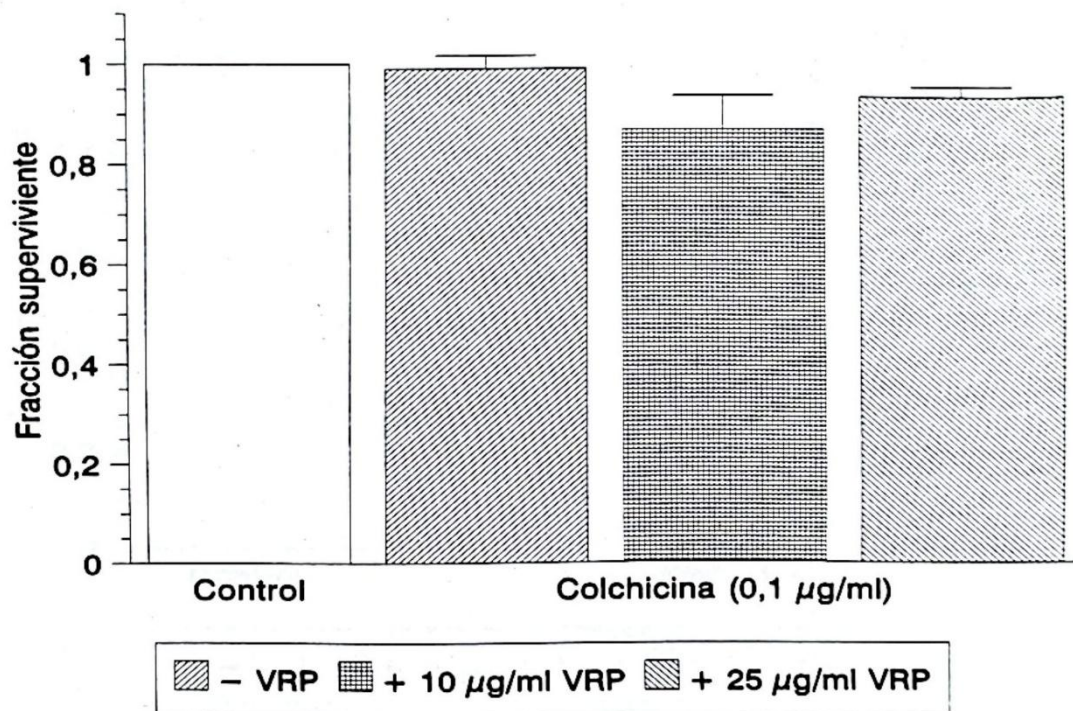


Figura IV.15.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a colchicina en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}. Se representa la media y desviación estándar de tres repeticiones. VRP: Verapamil.

Para el resto de drogas sí se encontraron diferencias significativas respecto al grupo tratado con 10 µg/ml de verapamil.

Así, para vinblastina (3 µg/ml) (fig. IV.16) se produjo un efecto contrario al esperado. El verapamil no revirtió la resistencia a la droga, sino que la potenció; obteniéndose una fracción superviviente mayor que la del grupo tratado con 10 µg/ml de verapamil ($p < 0,005$; t-Student). El resultado obtenido con 25 µg/ml de verapamil fue similar al grupo tratado en ausencia del mismo ($p > 0,05$; t-Student). Las diferencias respecto al control, sin droga, fueron significativas ($p < 0,005$; t-Student).

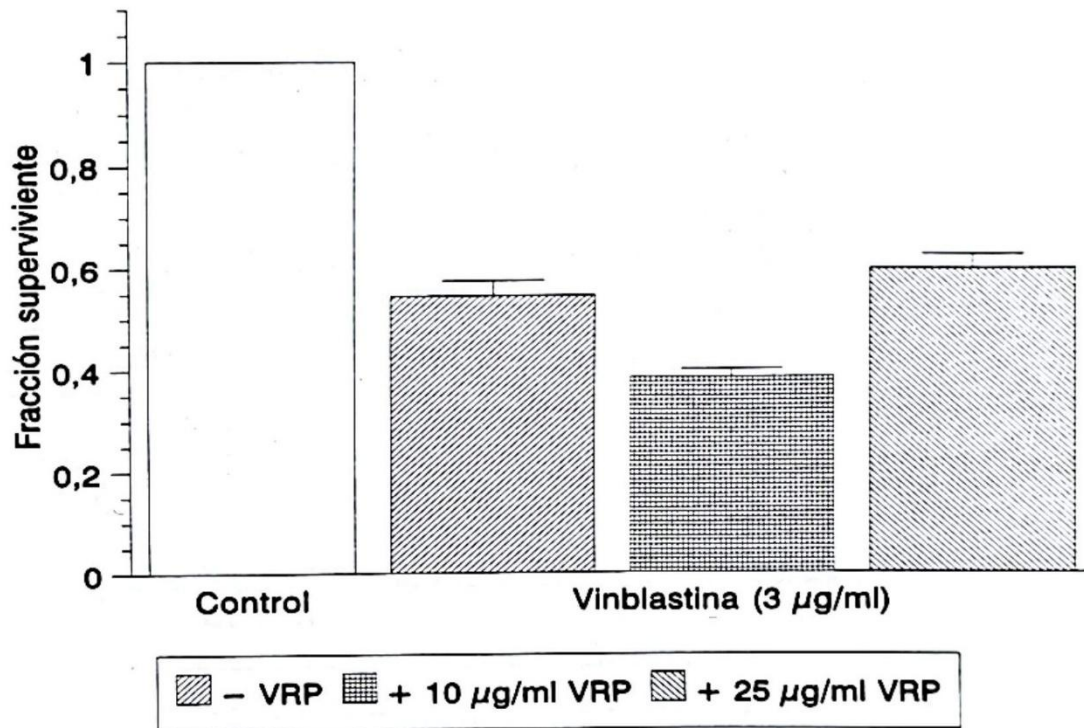


Figura IV.16.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a vinblastina en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}. Se representa la media y desviación estándar de tres repeticiones. VRP: Verapamil.

Para vincristina (1 µg/ml) se obtuvo un resultado igual al descrito anteriormente (fig. IV.17). El verapamil (25 µg/ml) no revirtió la resistencia, sino que la potenció; obteniéndose un aumento en la fracción superviviente, respecto al grupo tratado con 10 µg/ml de verapamil ($p < 0,05$; t-Student). El resultado que se obtuvo con 25 µg/ml de verapamil fue semejante al grupo no tratado ($p > 0,05$; t-Student). Las diferencias respecto al control, sin droga, fueron significativas ($p < 0,005$; t-Student).

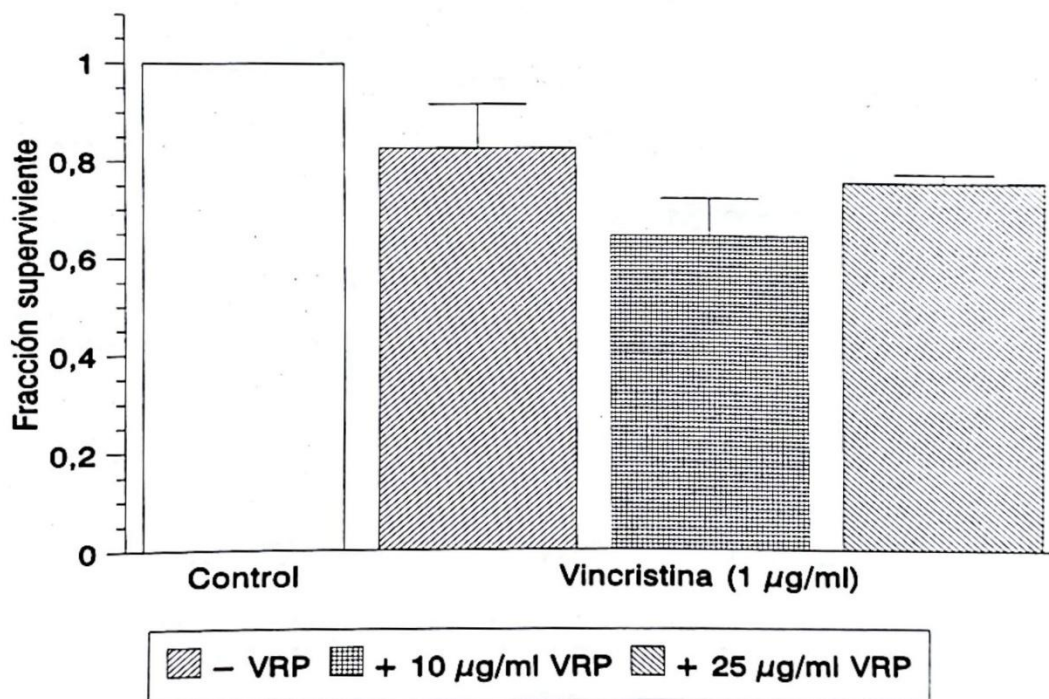


Figura IV.17.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a vincristina en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}.

Se representa la media y desviación estándar de tres repeticiones.

VRP: Verapamil.

Para mitomicina C (2 µg/ml) se obtuvo el mismo resultado (fig. IV.18). Al añadir verapamil (25 µg/ml) aumentó la fracción superviviente por encima de la que se obtuvo para el grupo tratado con 10 µg/ml ($p < 0,005$; t-Student). Igualmente, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$; t-Student) respecto al grupo no tratado con verapamil. Las diferencias fueron significativas ($p < 0,01$; t-Student) con respecto al grupo control.

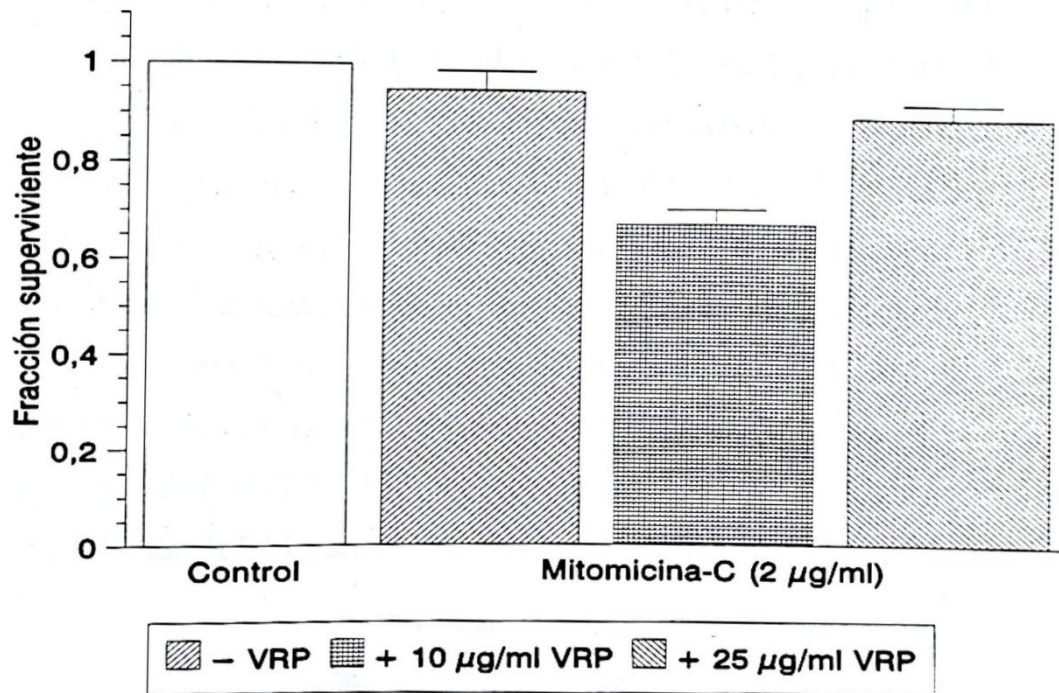


Figura IV.18.- Efecto del verapamil (25 µg/ml) sobre la reversión de resistencia a mitomicina C en la sublínea celular HCA-2/1^{CCH}. Se representa la media y desviación estándar de tres repeticiones. VRP: Verapamil.

Para la droga presente en la selección (colchicina) el aumento de verapamil a 25 µg/ml produjo el mismo efecto que con 10 µg/ml de verapamil. Sin embargo, para las otras drogas (vinblastina, vincristina y mitomicina C), el aumento de verapamil a 25 µg/ml produjo el efecto contrario; es decir, actuó como si no se le hubiera añadido nada de verapamil.

IV.6.- CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH).

La concentración de GSH total, correspondiente tanto a la forma oxidada como a la reducida, fue evaluada a lo largo de todo el proceso de selección. Los resultados que se obtuvieron se representan en la figura IV.19; donde se puede apreciar un incremento

considerable en los niveles de GSH total durante la selección. Partiendo de una concentración inicial de $0,39 \mu\text{M}$ para la línea parental (HCA), se llegaron a alcanzar valores de $1,25 \mu\text{M}$, para la sublínea seleccionada (HCA-2/1^{CCH}), ($p < 0,001$; t-Student) (tabla IV.5). Tras la exposición a colchicina, la concentración de GSH aumentó bruscamente hasta el día 26; pasando de $0,39 \mu\text{M}$ a $0,78 \mu\text{M}$. A partir de aquí se produjo una disminución no significativa estadísticamente ($p > 0,05$; t-Student). Nuevamente, se produjo un fuerte incremento a partir del día 40 ($0,73 \mu\text{M}$), hasta alcanzarse el valor máximo al final del proceso ($1,25 \mu\text{M}$). Las diferencias que se observaron durante la selección fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) según el análisis ANOVA-I. El incremento de concentración producido entre HCA y HCA-2/1^{CCH} fue de 3,21 veces.

IV.7.- ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST).

La actividad GST, medida a lo largo del proceso de selección, evolucionó de distinta forma. El valor inicial obtenido para la línea parental (HCA) fue de $1,15 \mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína. A partir de aquí y tan solo en 4 días de exposición a colchicina, aumentó hasta $1,46 \mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína ($p < 0,05$; t-Student) (fig. IV.19). Desde el día 4 hasta el 74 no se produjeron diferencias significativas en la actividad GST ($p > 0,05$; ANOVA-I, t-Student). Fue tras el aumento de dosis de colchicina a $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ y posterior selección del clon HCA-2/1^{CCH} (día 82) cuando se produjo un nuevo aumento en la actividad de esta enzima, alcanzándose el valor de $2,11 \mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína; ($p < 0,05$; t-Student). Durante el proceso de selección se pasó de una actividad de $1,15 \mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína, obtenida para la línea parental (HCA), a una actividad de $2,11 \mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína para la sublínea celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) ($p < 0,01$, t-Student) (tabla IV.5). El incremento de actividad producido entre HCA y HCA-2/1^{CCH} fue de 1,84 veces.

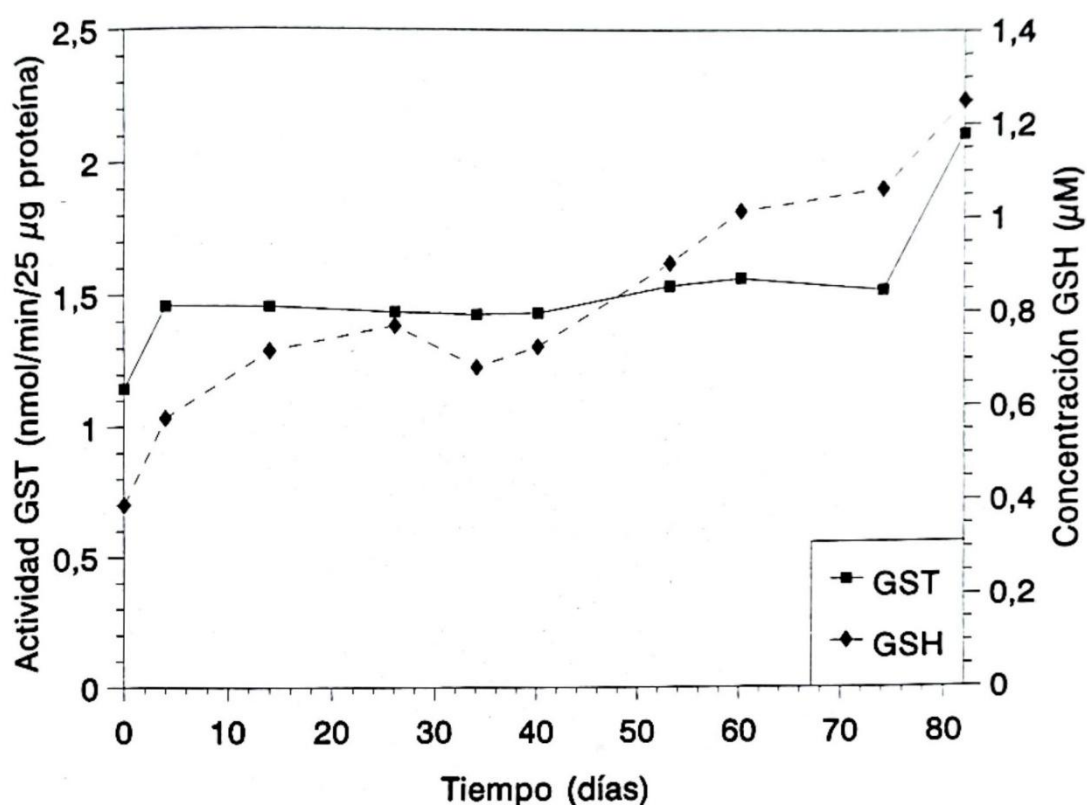


Figura IV.19.- Evolución de la actividad glutatión S-transferasa y de la concentración de glutatión total, durante el proceso de selección.

Cada punto de la curva representa la media de tres repeticiones.

GST: Glutatión S-transferasa. GSH: Glutatión total.

Día 0: Línea parental de adenocarcinoma de colon (HCA).

Día 82: Sublínea seleccionada de adenocarcinoma de colon (HCA-2/1^{CCH}).

Tabla IV.5.- Contenido en glutatión y actividad glutatión S-transferasa de ambas líneas celulares.

| | Línea celular | | Valor P ^(*) |
|-----------------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| | HCA | HCA-2/1 ^{CCH} | |
| GSH (µM) | 0,39 | 1,25 (3,21) | < 0,001 |
| GST (µmol/min/25 µg prot.) | 1,15 | 2,11 (1,84) | < 0,01 |

HCA: Línea parental de adenocarcinoma de colon humano.

HCA-2/1^{CCH}: Sublínea de adenocarcinoma de colon seleccionada con colchicina.

GSH: Glutatión total. GST: Glutatión S-Transferasa.

Entre paréntesis se expone el incremento obtenido respecto a la línea parental.

(*) Según el test t-Student.

V.- DISCUSIÓN

Durante los últimos años se han identificado, en líneas celulares cultivadas *in vitro*, varios mecanismos de resistencia a múltiples drogas. De todos ellos, la Gp-P es el que se expresa con mayor frecuencia; encontrándose una gran correlación entre el incremento de expresión de Gp-P y el desarrollo de resistencia a la quimioterapia (*Schneider et al., 1990; Volm et al., 1992*). En muchos casos, la resistencia se encuentra funcionalmente ligada a la amplificación y sobreexpresión de un miembro de la familia génica MDR que codifica para la Gp-P; y que actúa como una bomba extrusora dependiente de energía, que expulsa de la célula las drogas citotóxicas (*Gekeler et al., 1988*).

El fenotipo MDR se caracteriza por (*Twentyman et al., 1990a*):

- Resistencia cruzada a drogas no relacionadas ni estructural ni funcionalmente.
- Hiperexpresión de Gp-P; lo que contribuye a una menor acumulación celular de droga.
- Reversión parcial de la resistencia en presencia de verapamil.

V.1.- SELECCIÓN CON COLCHICINA DE SUBLINEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO.

Durante la exposición de una población celular a una determinada dosis de droga, se produce la muerte de las células sensibles, permitiéndose así el crecimiento y adaptación de las células resistentes (*Komiyama et al., 1989*). Las células de una población pueden presentar caracteres heterogéneos, a pesar de proceder de una única célula progenitora, debido a la aparición de mutaciones espontáneas (*Goldie y Coldman, 1983*). La frecuencia de aparición de clones resistentes es de 10^{-6} a cada paso de selección (*Kartner et al., 1983b*).

En este trabajo se utilizó colchicina como droga de selección debido a que, a pesar de no usarse en quimioterapia, tradicionalmente ha sido la droga asociada al fenotipo MDR más ampliamente descrita y usada en protocolos similares. Además, esta droga es capaz de inducir el fenotipo MDR en células sensibles (*Fojo et al., 1985; Pirker et al., 1990; Twentyman et al., 1990a*).

La dosis de droga que se utilizó inicialmente en el proceso de selección (0,5 µg/ml) se eligió arbitrariamente como el valor aproximado a la ID₅₀ que presentó la línea parental para colchicina (0,44 µg/ml) (*Gekeler et al., 1988*).

El clon celular elegido, tras la selección con colchicina, presentó una morfología celular más redondeada y con menos anclajes que la línea parental (fig. IV.2). Este hecho hizo suponer que quizás la población parental podría no ser totalmente homogénea; siendo las células más redondeadas las que presentaron mayor resistencia a esta droga y por tanto fueron las que sobrevivieron.

El clon celular HCA-2/1^{CCH}, elegido en virtud de su mayor valor de ID₅₀ de entre los clones seleccionados con colchicina (fig. IV.1), presentó células aberrantes de gran tamaño, igual que la línea parental (HCA); caracterizadas principalmente por ser auténticos sacos polinucleados. Esta anomalía quizás pudiera ser el reflejo de la tasa de mutación espontánea que sufren estas células en cultivo.

V.2.- RESISTENCIA A COLCHICINA DE LA SUBLÍNEA CELULAR SELECCIONADA.

Las células de adenocarcinoma de colon que se usaron en este estudio son intrínsecamente muy resistentes a colchicina, como se demuestra del valor de ID₅₀ que se obtuvo para la línea parental (HCA) (0,44 µg/ml) (tabla IV.1) y de la curva dosis-respuesta (fig. IV.3).

En este sentido, Pirker *et al.*, (1990) utilizando células KB-3-1 (subclón de células HeLa) sensibles a colchicina obtuvieron un valor de ID₅₀ para esta droga de 0,002 - 0,003 µg/ml. Estas células son entre 147 y 220 veces más sensibles que la línea de adenocarcinoma de colon (HCA) que se usó como parental en este estudio.

La colchicina se usa como antimitótico a dosis de 0,04 µg/ml/3h para detener las células de los cultivos en metafase y someterlas posteriormente a choque hipotónico para desperdigar los cromosomas y estudiar los cariogramas. En relación a estos datos, las dosis que se usaron durante la selección (0,5 y 1,0 µg/ml) constituyen dosis elevadas.

Las células que se obtuvieron tras el proceso de selección son aún más resistentes a colchicina que la línea parental (fig. IV.3). El valor de resistencia relativa que se obtuvo (3,32) es similar al de otros autores. Así, Fojo *et al.*, (1985) en la selección de sublíneas resistentes a colchicina, a partir de células de carcinoma KB (línea KB-3-1), obtuvieron dos sublíneas (KB-Ch^{R8} y KB-Ch^{R8-5}) cuya resistencia relativa es 2,1 y 3,8; respectivamente. Lemontt *et al.*, (1988) aislaron clones resistentes en un solo paso a partir de la línea de melanoma maligno humano (Melanoma Bowes), sensible a drogas, utilizando dosis muy bajas de colchicina (0,008 µg/ml) por un período de 6-8 semanas; obteniendo un valor de resistencia relativa de 3,9. Kartner *et al.*, (1983a) obtuvieron una resistencia relativa de 6,0

en la selección del clon CH^RA3, con 0,1 µg/ml de colchicina, a partir de la línea sensible de ovario de hamster chino AuxB1. Estos valores de resistencia se obtienen con dosis de colchicina más bajas que las que se utilizaron en la selección del clon HCA-2/1^{CCH}.

Sin embargo, cuando otros autores han utilizado dosis similares a las que se usaron en este trabajo, los resultados son muchos más elevados. Así, Pirker *et al.*, (1990) obtuvieron, por exposición a 1 µg/ml de colchicina, la sublínea MDR KB-C1; 100 veces más resistente que la sensible KB-3-1. Kartner *et al.*, (1983a) obtuvieron un valor de resistencia relativa de 26, utilizando 0,5 µg/ml de colchicina, en la selección de la sublínea ECH^R a partir de la línea LMTK⁻ de ratón. En este sentido, Twentyman *et al.*, (1990a) seleccionaron las líneas multirresistentes EMT6/CR0.2 y EMT6/CR2.0 a partir de la línea sensible EMT6/P de carcinosarcoma mamario de ratón, utilizando 0,2 y 2,0 µg/ml de colchicina durante la selección. La resistencia relativa obtenida por estos autores es de 16 y 181, respectivamente. LaQuaglia *et al.*, (1991) aislaron, a partir de la línea parental BE(2)-C de neuroblastoma humano, dos sublíneas celulares MDR (BE(2)-C/CHC) resistentes a 0,2 y 1 µg/ml de colchicina; obteniendo una resistencia relativa de 54 y 128.

Según estos datos, parece ser que en la selección de resistencia a una droga lo que más podría influir es la línea celular utilizada y no la dosis de selección. Los bajos niveles de resistencia que se alcanzaron en este trabajo, a pesar de que las células son intrínsecamente muy resistentes, podrían ser debidos al corto período de exposición a la droga durante la selección.

Estas sublíneas celulares descritas en la bibliografía, están potencialmente predisuestas a incrementar su resistencia tras continuas exposiciones a dosis crecientes de droga, tal y como describen Fojo *et al.*, (1985); que aislaron en cuatro pasos secuenciales cuatro sublíneas celulares humanas de carcinoma KB resistentes a colchicina. La resistencia

relativa que obtuvieron creció exponencialmente durante la selección: 2,1; 3,8; 40; 128; aunque inicialmente los niveles de resistencia fueron bajos. De la misma manera, Kartner *et al.*, (1985) seleccionaron 4 líneas de ovario de hámster chino, a partir de la línea AuxB1, resistentes a dosis crecientes de colchicina. Estas células muestran una resistencia creciente: 7; 31; 145; 640.

Todos estos datos indican que se pueden alcanzar en un sólo paso de selección bajos niveles de resistencia similares a los observados clínicamente; los cuales resultan de la expresión incrementada de al menos 1 miembro de la familia génica MDR (*Lemontt et al.*, 1988).

De esta forma, la obtención de la sublínea celular de adenocarcinoma de colon humano (HCA-2/1^{CCH}) demuestra la posibilidad de poder seleccionar *in vitro* células tumorales resistentes a colchicina, por exposición continua durante un corto período de tiempo; obteniéndose así bajos niveles de resistencia, similares a los descritos por otros autores. Además, posiblemente estas células podrían estar potencialmente predispuestas a incrementar de forma exponencial su nivel de resistencia, si se exponen a dosis crecientes de droga; para lo cual serían necesarios estudios posteriores. En orden a completar este estudio, sería muy útil el análisis de más líneas de adenocarcinoma de colon.

V.3.- RESISTENCIA CRUZADA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS.

Tanto la línea parental de adenocarcinoma de colon (HCA) como la sublínea seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) presentaron resistencia cruzada con otras drogas no presentes en el medio de selección (vinblastina, vincristina y mitomicina C). Los mayores valores de ID₅₀ se obtuvieron para vincristina: 5,985 µg/ml (HCA) y 15,679 µg/ml (HCA-2/1^{CCH}), (tabla IV.1).

La línea parental (HCA) presentó un valor de ID₅₀ para vincristina similar al descrito por Komiyama *et al.*, (1989) para la línea MDR HC-7-5/VCR, de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (ID₅₀: 2,8 µg/ml). Esta línea, resistente a vincristina, ha sido obtenida a partir de la línea sensible HC-7-5; la cual es 400 veces más sensible a esta droga (ID₅₀: 0,007 µg/ml).

La línea parental (HCA) presentó para mitomicina C el valor más bajo de ID₅₀ (0,534 µg/ml), similar al que se obtuvo para la droga de selección (tabla IV.1). Esta línea es muy resistente no sólo al agente de selección, sino también a las otras drogas ensayadas.

Entre los valores de ID₅₀ que se obtuvieron para la sublínea seleccionada cabe destacar el observado para vincristina (15,679 µg/ml), situado muy por encima del que se obtuvo para vinblastina (3,259 µg/ml) y mitomicina C (2,789 µg/ml) (tabla IV.1).

El valor de ID₅₀ que se obtuvo para vincristina es superior al de la línea MDR HC-7-5/VCR de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, resistente a 0,5 µg/ml de vincristina (ID₅₀: 2,8 µg/ml) (Komiyama *et al.*, 1989); y al de la línea de leucemia P388/VCR, descrita por Tsuruo *et al.*, (1982), la cual presenta un valor de ID₅₀ de 0,024 µg/ml; es decir, 653 veces menor al que se obtuvo para la línea HCA-2/1^{CCH}.

En contraposición a estos datos, la mayor resistencia relativa obtenida no fue para vincristina, sino para mitomicina C (5,22). Las resistencias relativas para vinblastina y vincristina fueron menores a la que se obtuvo para colchicina (tabla IV.1).

La resistencia a diferentes drogas varía según las líneas celulares (*Warr et al., 1988*). Usualmente, los niveles más altos corresponden al agente de selección (*Master, 1990*); aunque en otras ocasiones, como es este caso, la resistencia cruzada a una droga es mayor que la observada para la droga de selección (*Biedler, 1992*).

En este sentido *Lemontt et al., (1988)*, seleccionaron varias líneas de melanoma maligno Bowes resistentes a vinblastina y colchicina (VBL3, VBL4, COL1). Las tres sublíneas presentan resistencia cruzada con vincristina, vinblastina y colchicina, aunque la resistencia relativa es mayor para vincristina en todas ellas.

Los bajos niveles de resistencia relativa que se obtuvieron para la línea HCA-2/1^{CCH} son similares a los que presentan otras líneas celulares multirresistentes descritas. Así, la sublínea de carcinoma KB (KB-Ch^R8-5), seleccionada con colchicina por *Fojo et al., (1985)*, presenta resistencia cruzada con vinblastina y vincristina. Los valores de resistencia relativa descritos son de 3,8 para colchicina, 6,3 para vinblastina y 18 para vincristina. Las líneas de melanoma maligno Bowes seleccionadas independientemente con vincristina, vinblastina y colchicina (VCR4.5/4; VCR7.5/4; VBL3; VBL4 y COL1), muestran resistencia cruzada con las otras drogas. Los niveles de resistencia oscilan entre 2,2 - 4,7 para colchicina, 4,3 - 9,2 para vinblastina y 9,7 - 23,7 para vincristina (*Lemontt et al., 1988*). Estos autores han realizado la selección con dosis que oscilan entre 0,003 - 0,008 µg/ml.

Por el contrario, líneas celulares seleccionadas con dosis similares a las que se usaron, presentan valores de resistencia relativa muy elevados. Así, la línea celular EMT6/CR2.0 de carcinosarcoma mamario de ratón obtenida a partir de la línea parental EMT6/P con 2,0 µg/ml de colchicina, por *Twentyman et al., (1990a)*, presenta una resistencia relativa de 181 para la droga de selección y de 43 para vincristina. Estos autores han seleccionado a partir de la misma línea parental EMT6/P una línea resistente a

vincristina (1,0 µg/ml) denominada EMT6/VR1.0 cuya resistencia relativa a esta droga es de 56 y a colchicina de 64.

En este mismo sentido, las líneas celulares de carcinoma KB (KB-C3, KB-C4, KB-V1), seleccionadas independientemente con colchicina (3-4 µg/ml) y vinblastina (1 µg/ml) por Willingham *et al.*, (1986), presentan resistencia cruzada a colchicina, vinblastina y vincristina; con valores de resistencia relativa entre 171 y 1750. Kirschner *et al.*, (1992), seleccionando las líneas celulares de macrófagos murinos (J7.V1-1, J7.V3-1, J7.C1-20), resistentes a vinblastina (0,9 y 2,7 µg/ml) y a colchicina (0,4 µg/ml), han obtenido valores de resistencia relativa entre 17 y 1083 para vinblastina y entre 268 y 550 para colchicina.

Según todos estos datos, los niveles de resistencia son independientes del tipo de droga utilizada en la selección. El patrón de resistencia cruzada probablemente no depende de la dosis empleada durante la selección, sino quizás del factor más importante: el tipo celular.

Probablemente la baja resistencia relativa que se obtuvo podría deberse a dos factores; por un lado a que las células parentales (HCA) ya eran intrínsecamente muy resistentes a estas drogas, y por otro al corto período de exposición (11 semanas).

En orden a diseñar mejores protocolos de tratamiento y drogas capaces de abordar el fenotipo multirresistente, se hace importante la necesidad de desarrollar líneas celulares MDR *in vitro*, obtenidas de diferentes tejidos, que muestren bajos niveles de resistencia relativa (Lemontt *et al.*, 1988).

Las células de tumores humanos pueden ser cultivadas selectivamente en cultivos primarios a partir de tumores. Esto nos permite poder ensayar la sensibilidad a drogas que presentan estos tumores. Cada clon celular exhibe características de sensibilidad diferentes, sugiriendo que las poblaciones tumorales son heterogéneas (*Komiyama et al., 1989*).

V.4.- EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P.

La resistencia a múltiples drogas es un fenómeno que se ha puesto en evidencia tras la selección *in vitro* de líneas celulares, mediante tratamiento con incremento de dosis de un sólo agente citotóxico como la vincristina, colchicina, adriamicina o actinomicina D (*Gekeler et al., 1988*). La expresión de la Gp-P está correlacionada con el grado de resistencia a drogas (*Bell et al., 1985*), siendo éste el mecanismo principal de resistencia en células con fenotipo MDR.

La citometría de flujo es una técnica que se usa, entre otras cosas, para estudiar las alteraciones citocinéticas *in vitro* que se producen en células incubadas con drogas, y la sensibilidad de las fases del ciclo celular a los agentes citotóxicos. También se usa para estudiar la resistencia a drogas y para aislar células drogo-resistentes. Se han hecho estudios preliminares para aplicar estas técnicas a las muestras de tumores sólidos extraídos de pacientes tratados con agentes citotóxicos. Esto debería contribuir a un mejor entendimiento del mecanismo de acción de estas drogas y al desarrollo de un ensayo *in vitro* para predecir la multirresistencia (*Van Dam et al., 1992*).

La citometría de flujo nos permite:

- Identificar diferentes subpoblaciones en función de los marcadores expresados en superficie.
- Determinar la proporción de células de una subpoblación dada en el conjunto de la muestra estudiada.

- Evaluar en una población celular que expresa un antígeno determinado, la intensidad con que cada célula individual lo expresa.
- Efectuar de forma simultánea medidas de otros componentes o propiedades celulares en estudios multiparamétricos.
- Separación y aislamiento de subpoblaciones celulares.

La citometría de flujo es una técnica que nos permite estudiar múltiples parámetros celulares de una forma rápida, sensible, cuantitativa, reproducible, con precisión y rigor estadístico; con la posibilidad de efectuar estudios multiparamétricos y, en algunos aparatos, incluso de separar células viables para subsiguientes estudios (*Pizarro et al., 1992*).

Existen numerosos anticuerpos monoclonales específicos para la Gp-P. Así, el C219 descrito por Niehans *et al.*, (1992) y Kartner *et al.*, (1985), reconoce una secuencia de aminoácidos altamente conservada encontrada en todas las moléculas de Gp-P; incluyendo la humana MDR-1 y MDR-2/MDR-3. Sin embargo, el anticuerpo MRK-16, se ha visto que es específico para la Gp-P MDR-1 (*Niehans et al., 1992*). Existen otros muchos anticuerpos monoclonales como el 265/F4 (*Volm et al., 1988*), el 4E3 (*Arceci et al., 1993*) y el JSB-1 (*Volm et al., 1992*).

De todos ellos se utilizó el anticuerpo JSB-1, que según Nygren y Larsson, (1990) da resultados similares a los que se obtienen con el anticuerpo C219.

Como se puede ver en la figura IV.7, tanto la línea parental (HCA) como la sublínea seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) expresaron grandes cantidades de Gp-P. Este hecho supone una prueba más de que la población parental (HCA) presentó resistencia a drogas mediada por Gp-P; aunque en menor grado que la sublínea HCA-2/1^{CCH}. La sublínea seleccionada presentó 2,35 veces más Gp-P que la parental, como se dedujo al comparar los canales de fluorescencia del pico máximo en ambas poblaciones (fig. IV.7) (tabla IV.2).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Twentyman *et al.*, (1990a) para las líneas EMT6/CR0.2 y EMT6/CR2.0 de carcinosarcoma mamario de ratón. La línea CR2.0 (resistente a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina), cuya resistencia relativa es 181 respecto de la línea parental EMT6/P, presenta 2,5 veces más Gp-P que la CR0.2; resistente a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina y cuya resistencia relativa respecto a EMT6/P es de 16. La línea CR2.0 presenta, respecto a CR0.2, un incremento de resistencia relativa de 11,3 para la droga de selección (colchicina), mientras que HCA-2/1^{CCH} mostró un incremento de 3,32. Quizás la diferencia en resistencia relativa y en Gp-P que presentan las células EMT6/CR2.0, respecto a la sublínea HCA-2/1^{CCH}, podría ser debida al uso de una concentración de colchicina mayor (2,0 $\mu\text{g/ml}$) durante la selección, o a las características propias de la línea celular. El grado de resistencia a drogas de estas líneas MDR derivadas de la línea parental EMT6/P se correlaciona con la cantidad de Gp-P que expresan en sus membranas (Reeve *et al.*, 1989). De igual manera sucede para las líneas MDR de hámster chino CH^RA3, CH^RB3, CH^RC5 y CH^RB30 seleccionadas con colchicina a partir de la línea AuxB1 (Kartner *et al.*, 1985).

Los niveles de Gp-P que se obtuvieron durante el proceso de selección (fig. IV.7 y IV.9) (tabla IV.2) son similares a los que expresan la línea MDR CH^RB3 y la derivada de ella CH^RC5, seleccionada con 10 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina (Kartner *et al.*, 1985). La línea HCA presentó un histograma similar al de la línea CH^RB3, con un pico máximo de fluorescencia para Gp-P alrededor del canal 30. La sublínea HCA-2/1^{CCH} presentó a su vez un histograma similar al de la línea CH^RC5, cuyo pico máximo de fluorescencia para Gp-P se sitúa alrededor del canal 70. Estas células MDR, descritas por Kartner *et al.*, (1985), han sido seleccionadas con concentraciones de colchicina más altas (3,0 y 10,0 $\mu\text{g/ml}$). Presentan una resistencia relativa de 4,64 una respecto de la otra, y de 31 y 145 respecto de la línea parental AuxB1.

En este mismo sentido, la línea HCA presentó un nivel de fluorescencia para Gp-P similar al de la sublínea MDR CEM/VLB5000 de leucemia linfoblástica, seleccionada con 5 $\mu\text{g/ml}$ de vinblastina y con una resistencia relativa de 4000 respecto a su línea parental

CCRF-CEM (*Kartner et al., 1985*). De igual manera, Boiocchi y Toffoli, (1992) seleccionaron, a partir de la línea sensible SW948, una línea celular de carcinoma de colon humano resistente a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de doxorubicina (SW948-R-100), cuya resistencia relativa a vincristina es 3,5. Esta línea presenta un histograma con unos niveles de Gp-P similares a los que se obtuvieron para la sublínea HCA-2/1^{CCH}.

El poco incremento que se obtuvo en los niveles de Gp-P podría ser debido a que la línea parental (HCA) ya presentaba altos niveles de Gp-P o que la dosis de droga de selección que se utilizó fue demasiado baja. De cualquier manera las dos poblaciones celulares (HCA y HCA-2/1^{CCH}) presentaron niveles de Gp-P similares a las líneas celulares MDR más resistentes descritas en la bibliografía.

Durante el desarrollo de la selección se produjo un aumento de la fluorescencia media hasta el día 74, sin aumento significativo del canal de fluorescencia del pico máximo. Este hecho podría haber sido provocado por el aumento en altura observado para el segundo pico (más pequeño), que apareció en los histogramas durante este período (fig. IV.8 y IV.9). Después del segundo paso de selección (días 74 a 82) se produjo una disminución brusca del canal medio de fluorescencia, que podría haber sido provocado por la eliminación de las células del segundo pico tras el picado de clones. El aumento súbito producido en el canal de fluorescencia del pico máximo (fig. IV.8) se debe al aumento de fluorescencia, y por tanto de Gp-P, tras el segundo paso de selección.

En la figura IV.9 se representa la evolución de los histogramas a lo largo del proceso de selección. El segundo pico que apareció (más pequeño) podría ser causa de la heterogeneidad de la población parental en cuanto a expresión de Gp-P, apareciendo una subpoblación menos representada con mayores niveles de Gp-P en sus membranas. Durante la selección de resistencia se produjo un aumento en altura de este segundo pico, que quizás

reflejado en un aumento de la fluorescencia media (fig. IV.8) (días 26-74), podría suponer una mayor representación de esta subpoblación. La desaparición de este segundo pico podría haber sido provocada por el picado de clones, tras el cual se aisló un clon celular perteneciente al primer pico mayoritario.

En cada línea MDR la cantidad global de Gp-P es proporcional al contenido en ARNm MDR1 (*Boiocchi y Toffoli, 1992*). En este sentido las células de leucemia de ratón resistentes a drogas antineoplásicas (ej.: F4-6RADR) expresan altos niveles de ARNm *mdr1* y altos niveles de Gp-P (*Höllt et al., 1992*).

La capacidad para identificar tumores que presenten resistencia a múltiples drogas, mediante medición de los niveles de Gp-P y/o ARN, podría tener importantes consecuencias en el tratamiento de pacientes con cáncer. Estos ensayos podrían permitir la identificación de tumores humanos potencialmente susceptibles al fracaso en la respuesta a la quimioterapia (*Volm et al., 1988*).

V.5.- EFECTO DEL VERAPAMIL SOBRE LA REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS.

La mayoría de las estrategias para abordar la resistencia a múltiples drogas asociada a Gp-P involucran la inhibición del eflujo provocado por esta bomba de membrana. Así, entre los inhibidores más usados se encuentran en primer lugar las moléculas lipofílicas con anillos aromáticos planos y un nitrógeno básico, tales como verapamil, reserpina y fenotiacinas. Entre otras moléculas lipofílicas que no siguen esta regla se encuentran las ciclosporinas y sus análogos no inmunosupresores (ej.: PSC388). Otras moléculas incluyen al factor de necrosis tumoral, inmunotoxinas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas MDR1 y anticuerpos anti-Gp-P (*Beck, 1995*).

De todos ellos se usó verapamil por ser la molécula utilizada en la reversión del fenotipo MDR más ampliamente descrita y por constituir ésta una característica esencial en la definición de este fenotipo.

El mecanismo de acción por el cual el verapamil revierte la resistencia es por una inhibición competitiva de la unión entre la Gp-P y las drogas citotóxicas (Nygren y Larsson, 1990); conduciendo a una acumulación intracelular de droga (Pirker *et al.*, 1990; Höllt *et al.*, 1992; Bowles *et al.*, 1990). El verapamil compite con las drogas por unirse a la Gp-P; siendo, por sí mismo, un sustrato de esta molécula (Twentyman *et al.*, 1990b).

En este estudio se eligió 10 µg/ml como dosis de verapamil porque, tal y como describen Fojo *et al.*, (1985), ésta es la dosis óptima descrita para incrementar la incorporación de drogas y la sensibilidad de las células mutantes resistentes. Así, la incorporación de vinblastina, colchicina y vincristina se incrementa con el aumento de la concentración de verapamil, obteniéndose el máximo valor a 10 µg/ml, en líneas celulares de carcinoma KB seleccionadas con colchicina (Fojo *et al.*, 1985).

Los niveles de verapamil alcanzables en plasma, que son tolerables clínicamente en pacientes, varían desde 0,25 - 4,0 µg/ml (Bowles *et al.*, 1990). Las altas dosis (1000 mg/día) se toleran bien y producen en plasma concentraciones del orden de 2 µg/ml (Höllt *et al.*, 1992).

Tal y como se puede apreciar en las figuras IV.11, IV.12 y IV.13, el verapamil revirtió parcialmente la resistencia que presentan las células HCA-2/1^{CCH} a las drogas vinblastina, vincristina y mitomicina C; obteniéndose para la droga de selección (colchicina) una reversión notablemente mayor (fig. IV.10).

Este hecho podría ser debido a que la colchicina tiene menor afinidad por la Gp-P que el resto de las drogas, por lo que podría ser reconocida y transportada al exterior celular con menor eficacia; originándose un efecto mayor de reversión a igual dosis de verapamil (*Twentyman et al., 1990a*). El verapamil produce, en la línea celular AuxB1 de ovario de hámster chino y a bajas concentraciones, un incremento en la acumulación de vinblastina y colchicina, (0,98 - 2,46 $\mu\text{g/ml}$ de verapamil para vinblastina y 4,91 $\mu\text{g/ml}$ para colchicina) (*Cano-Gauci y Riordan, 1987*). Por encima de este rango se producen pequeñas influencias en la incorporación de estas drogas. Para la línea celular B30, resistente a 30 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina, la estimulación en la acumulación de vinblastina ocurre sólo a altas concentraciones de verapamil; mientras que no hay incremento en la retención de colchicina a ninguna concentración del mismo. La capacidad del verapamil para afectar a la acumulación de vinblastina pero no a la de colchicina, en estas células resistentes (B30), sugiere que debe haber algunas diferencias en el mecanismo de acción de las drogas involucradas en el fenotipo MDR (*Cano-Gauci y Riordan, 1987*).

Sin embargo, existen ejemplos contrarios a la sensibilización; como el descrito por Goodman *et al., (1987)* en el que dos tumores (melanoma y linfoma) no muestran *in vitro* incremento en la sensibilidad a vinblastina cuando se combinan con verapamil. Este autor argumenta que no existe evidencia de interacción verapamil-vinblastina para cáncer de mama, ovario, pulmón o colon. Goodman *et al., (1987)* no han encontrado modulación sustancial del efecto de vinblastina con concentraciones *in vitro* de verapamil de 1,5 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

En contraposición a estos datos y en favor de los resultados que se obtuvieron en este trabajo, Nygren y Larsson, (*1990*) afirman que el verapamil potencia el efecto de drogas citotóxicas en carcinoma de pulmón murino, melanoma, adenocarcinoma de colon, líneas celulares de glioma humano y sobre cultivos primarios de adenocarcinoma de colon humano.

El mayor efecto revertidor se obtuvo para la droga de selección (colchicina), tal y como se dedujo del valor de ID₅₀ obtenido y de la tasa de sensibilización relativa (7,41) (tabla IV.4). El resto de drogas mostraron una tasa de sensibilización mucho más baja, siendo ésta mayor para los alcaloides de la vinca (1,25 y 2,36), que para mitomicina C, cuyo valor fue el más bajo (1,17) (tabla IV.4).

Los resultados que se obtuvieron no coinciden con los descritos por Fojo *et al.*, (1985) para la línea multirresistente KBCh^R8-5-11-24 de carcinoma KB. Esta línea presenta una tasa de sensibilización para colchicina, vinblastina y vincristina de 62,86; 38,33 y 182,5 respectivamente; cuando se utiliza verapamil a 10 µg/ml como agente revertidor. Además, la mayor tasa de sensibilización de esta línea es para vincristina y no para la droga de selección (colchicina). Otros autores han encontrado tasas de sensibilización elevadas para dosis de verapamil más bajas. Así, las células de leucemia P388/VCR, resistentes a vincristina, presentan una tasa de sensibilización para esta droga de 84, al coincubarla con 3,24 µg/ml de verapamil; y de 26, con una dosis de verapamil de 1,62 µg/ml (Tsuruo *et al.*, 1982).

Höllt *et al.*, (1992) afirman que la coincubación con verapamil (1 µg/ml) aumenta de 13-18 veces la citotoxicidad de vinblastina en la línea F4-6RADR de leucemia de ratón. Esta línea celular resistente muestra un incremento en el contenido de vinblastina cuando se coincuba con verapamil a dosis entre 0,15 y 14,7 µg/ml.

Los resultados que se obtuvieron son similares a los descritos por otros autores para dosis de verapamil más bajas. Así, las líneas MDR CR0.2 y CR2.0, de carcinosarcoma mamario de ratón, presentan unas tasas de sensibilización relativa que oscilan entre 3,5 - 7,5 para vincristina y entre 1,8 - 8 para colchicina; para una dosis de verapamil de 3,24 µg/ml. Cuando la dosis de verapamil es de 1,62 µg/ml la tasa de sensibilización también desciende

a valores de 1,4 - 4,1 para vincristina y de 1 - 2,8 para colchicina. En estas líneas celulares la sensibilización es dependiente de la dosis de verapamil usada y de la mayor resistencia de las células a la droga (*Twentyman et al., 1990a*).

Komiyama et al., (1989) han descrito, para otras drogas como la adriamicina, valores de sensibilización relativa similares a los que se obtuvieron para la sublínea HCA-2/1^{CCH}. Estos valores oscilan entre 2 - 3, para concentraciones de verapamil de 10 µg/ml, en células HC-2-6 y HC-7-5 de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Al aumentar la dosis de verapamil a 25 µg/ml se obtuvieron resultados contradictorios con los descritos por otros autores. El verapamil revirtió la resistencia en presencia de colchicina, pero no hubo diferencias significativas con respecto al grupo que se trató con 10 µg/ml de verapamil (fig. IV.15).

Para el resto de drogas, el verapamil a 25 µg/ml no revirtió la resistencia, sino que la potenció significativamente; obteniéndose un resultado similar al hallado en ausencia de verapamil (fig. IV.16, IV.17 y IV.18).

Así, *Pirker et al., (1990)* demostraron que el verapamil potencia la actividad de la colchicina en forma dependiente de dosis; encontrando que a 5 µg/ml de verapamil se revierte casi completamente la resistencia a esta droga en la línea KB-C1. Las líneas de glioblastoma multiforme U87, U373, T98G y la línea AA de astrocitoma fibrilar, muestran una sensibilización relativa entre 2,24 y 4,14 con 20 µg/ml de verapamil (*Bowles et al., 1990*). Este autor encuentra efectivas para estas líneas celulares dosis de verapamil en un rango que oscila entre 2 y 200 µg/ml.

Woodcock *et al.*, (1993) afirman que existe efecto sensibilizante significativo usando concentraciones de verapamil en el rango de dosis entre 5 - 50 $\mu\text{g/ml}$. Estos autores hacen especial hincapié en que el verapamil a 20 $\mu\text{g/ml}$ produce un desplazamiento de vincristina entre el 16,8 y el 28,6 %; siendo la magnitud de esta reducción independiente de la concentración de droga. En las líneas U87, U373, T98G de glioblastoma multiforme y AA de astrocitoma fibrilar, la adición de verapamil a dosis no tóxicas (2 $\mu\text{g/ml}$) y más altas (20 $\mu\text{g/ml}$) aumentan significativamente la actividad citotóxica de las drogas antineoplásicas (Bowles *et al.*, 1990).

Los bajos valores de sensibilización que se obtuvieron para la sublínea HCA-2/1^{CCH}, quizás pudieron ser causa del corto período de incubación con verapamil o, lo que podría ser más probable, del tipo celular.

Por otro lado, se han descrito líneas celulares que presentan resistencia al verapamil; entre las que se encuentran las sublíneas MDR de la línea EMT6/P de carcinosarcoma mamario de ratón (Reeve *et al.*, 1989).

El verapamil es, por sí mismo, una droga involucrada en el fenotipo MDR. Para la línea parental EMT6/P y la sublínea EMT6/AR1.0, resistente a adriamicina, la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ de verapamil no causa sensibilización alguna. A dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$ sólo hay efecto en la línea sensible (Twentyman *et al.*, 1990b).

El verapamil es una droga que presenta una notable actividad citostática en las líneas celulares U87, U373, T98G y AA, descritas anteriormente. A dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$ el valor de citotoxicidad varía desde 4,5 a 27,5 %. Para dosis mayores (20 $\mu\text{g/ml}$) la actividad citostática

del verapamil oscila entre el 20 y 30 %; mientras que a dosis extremas (200 µg/ml) se alcanzan valores del 50 al 65 % (*Bowles et al., 1990*).

El mayor efecto del verapamil se produce en líneas resistentes a drogas; obteniéndose menores efectos en líneas sensibles. La actividad antitumoral producida se lleva a cabo en células con fenotipo MDR mediado por el sistema MDR1/bomba P-170 (*Bowles et al., 1990*). La cantidad de verapamil necesaria para sensibilizar una línea celular está correlacionada con la cantidad de Gp-P que expresa (*Twentyman et al., 1990a*).

Hay que hacer especial mención en que, para las células multirresistentes de carcinoma KB (KB-C1, KB-C4 y KB-A1), la potencia de reversión del verapamil no difiere entre el isómero (R-) o el (L-) y la forma racémica (*Pirker et al., 1990*). De igual manera sucede para las células de leucemia de ratón F4-6RADR (*Höllt et al., 1992*).

El verapamil afecta a la incorporación inicial de droga, provocando una menor acumulación intracelular de agentes antineoplásicos (*Fojo et al., 1985*). Esta, quizás podría ser una explicación aproximada a los contradictorios resultados que se obtuvieron usando 25 µg/ml de verapamil; aunque tal y como ampliamente se ha descrito en la bibliografía, el efecto del verapamil es la inhibición del eflujo de droga mediado por Gp-P (*Weber et al., 1989*).

De cualquier manera, la quimiosensibilización es un proceso complejo y multifactorial; que depende de la droga citotóxica, el tipo de sensibilizador y dosis empleada, así como la cantidad de Gp-P que expresa la línea celular (*Twentyman et al., 1990a*).

V.6.- CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH) Y ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST).

Se ha demostrado que la resistencia mediada por GSH y las enzimas dependientes de él, constituyen, después de la Gp-P, una de las causas más frecuentes de resistencia a drogas (*Lewis et al., 1988; Wolf et al., 1987*).

Tras el proceso de selección se obtuvo un incremento de concentración de GSH de 3,21. Este resultado es similar al obtenido por *Lewis et al., (1992)* para la línea resistente ES-2R de carcinoma de ovario humano; la cual presenta un incremento de GSH de 1,5 veces en relación a la línea parental sensible (ES-2).

Las diferentes moléculas de GST constituyen una familia multigénica de isoenzimas citosólicas diméricas que se dividen en tres grupos denominados α , μ y π . El método que se utilizó mide la actividad GST total de los tres grupos (*Lewis et al., 1992*). Tras el proceso de selección se produjo un incremento de actividad GST de 1,84 veces. El resultado obtenido es similar al descrito por *Lewis et al., (1992)* para la línea resistente ES-2R; la cual presenta un incremento de actividad GST de 2,6 veces en relación a la línea parental sensible ES-2. Por otro lado, la línea RK13/R de riñón de conejo presenta un incremento de actividad de 1,042; en relación a la línea sensible RK13 (*Neale y Matthews, 1989*).

Los valores absolutos de GST que se obtuvieron para las líneas HCA y HCA-2/1^{CCH} son muy similares a los que presentan las líneas ES-2 (1,68 $\mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína) y ES-2R (4,29 $\mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína) (*Lewis et al., 1992*) (tabla IV.5). Sin embargo, son muy bajos en relación a los descritos por *Neale y Matthews, (1989)*. Así, las líneas L929/R de fibroblastos de ratón y la U937/R mielomonocítica humana presentan un valor de GST de 21 $\mu\text{mol}/\text{min}/25 \mu\text{g}$ proteína.

VI.- CONCLUSIONES

1. La línea celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) presenta fenotipo MDR; ya que, en el presente estudio se ha demostrado que:
 - Presenta resistencia cruzada con drogas no relacionadas.
 - Hiperexpresa la glicoproteína-P.
 - El verapamil revierte parcialmente la resistencia a las drogas ensayadas.
2. A partir de la línea de adenocarcinoma de colon humano (HCA) utilizada como parental, se pueden seleccionar *in vitro*, durante un corto período de tiempo, células tumorales resistentes a colchicina. Se obtienen de esta forma bajos niveles de resistencia relativa a citostáticos, similares a los descritos en otros estudios.
3. La línea parental de adenocarcinoma de colon (HCA) presenta resistencia cruzada con las drogas ensayadas e hiperexpresión de glicoproteína-P. Se trata de una línea celular intrínsecamente muy resistente, como se deduce comparando los resultados obtenidos con los de otros estudios para las líneas MDR más quimiorresistentes.
4. Ambas poblaciones celulares, parental y seleccionada, expresan niveles de glicoproteína-P similares a los de las líneas MDR más resistentes descritas en la bibliografía.
5. La población seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) se muestra más resistente a las drogas ensayadas que la población parental (HCA).
6. La línea celular seleccionada (HCA-2/1^{CCH}) expresa mayores niveles de glicoproteína-P, glutatión total y glutatión S-transferasa que la línea parental.
7. Durante el proceso de selección de la línea HCA-2/1^{CCH} se produce un incremento progresivo de los niveles de glutatión total.
8. La actividad glutatión S-transferasa únicamente aumenta tras los incrementos de dosis de colchicina aplicados durante la selección de esta línea celular y bajo las condiciones de ensayo utilizadas. No se produce ningún incremento de esta actividad para una dosis de colchicina constante en el tiempo.

9. La citometría de flujo constituye una técnica rápida y eficaz en la detección de glicoproteína-P, y por tanto de resistencia a drogas mediada por este mecanismo.

10. La evaluación de la expresión de glicoproteína-P, GSH y GST en biopsias de neoplasias, puede ser un parámetro de utilidad a la hora de optimizar los protocolos quimioterápicos, de acuerdo con las características biológicas específicas de cada tumor.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

ALI-OSMAN F (1989). Quenching of DNA cross-link precursors of chloroethyl-nitrosoureas and attenuation of DNA interstrand cross-linking by glutathione. *Cancer Res*, 49:5258-5261.

ANDERSON ME (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth Enzymol*, 113:548-555.

ARCECI RJ, STIEGLITZ K, BRAS J, SCHINKEL A, BAAS F & CROOP J (1993). Monoclonal antibody to an external epitope of the human mdr1 P-glycoprotein. *Cancer Res*, 53:310-317.

ARRICK BA & NATHAN CF (1984). Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res*, 44:4224-4232.

AZZARIA M, SCHURR E & GROS P (1989). Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the mdr1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol*, 9:5289-5297.

BASKIN F, ROSENBERG RN & DEV V (1981). Correlation of double-minute chromosomes with unstable multidrug cross-resistance in up-take mutants of neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:3654-3658.

BATIST G, BEHRENS B, MAKUCH R, et al (1986). Serial determination of glutathione levels and glutathione-related enzyme activities in human tumor cells in vitro. *Biochem Pharmacol*, 35:2257-2259.

BECH-HANSON NT, TILL JE & LING V (1976). Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol*, 88:23-32.

BECK WT (1987). The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol*, 36:2879-2887.

BECK WT (1995). Circumvention of multidrug resistance with anti-P-glycoprotein antibodies: clinical potential or experimental artifact. *J Natl Cancer Inst*, 87(2):73-75.

BECK WT & CIRTAIN MC (1982). Continued expression of vinca alcaloid-resistance by CCRF-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase. *Cancer Res*, 42:184-189.

BECK WT & QIAN X (1992). Photoaffinity substrates for P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*, 43(1):89-93.

BELL DR, GERLACH JH, KARTNER N, BUICK RN & LING V (1985). Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J Clin Oncol*, 3:311-315.

BIEDLER JL (1992). Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer*, 70:1799-1809.

BIEDLER JL & RIEHM H (1970). Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res*, 30:1174-1184.

BIEDLER JL, RIEHM H, PETERSON RHF & SPENGLER BA (1975). Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst*, 55:671-680.

BOIOCCHIM & TOFFOLI G (1992). Mechanism of multidrug resistance in human tumour cell lines and complete reversion of cellular resistance. *Eur J Cancer*, 28(617):1099-1105.

BOWLES AP, PANTAZIS CG & WANSLEY W (1990). Use of verapamil to enhance the antiproliferative activity of BCNU in human glioma cells: an in vitro and in vivo study. *J Neurosurg*, 73:248-253.

BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, 72:248-254.

BRADLEY G, JURANKA PF & LING V (1988). Mechanism of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 948: 87-128.

BRIAN LJ, DALTON W, FISHER GA & SIKIC BI (1993). Reversal of multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Cancer suppl*, 72:3484-3488.

BURT RK, GARFIELD S, JOHNSON K & THORGEIRSSON SS (1988). Transformation of rat liver epithelial cells with v-H-ras or v-raf causes expression of mdr1 glutathione S-transferase π and increased resistance to cytotoxic chemicals. *Carcinogenesis*, 9:2329-2332.

BUSCH FW, SCHMITTELE U & EHNINGER G (1990). Toxicity of novel anthracycline derivatives towards normal myeloid bone marrow progenitor cells (CFU-GM) is not increased by verapamil. *Blut*, 60:219-222.

CANO-GAUCI DF & RIORDAN JR (1987). Action of calcium antagonists on multidrug resistant cells. Specific cytotoxicity independent of increased cancer drug accumulation. *Biochem Pharmacol*, 36(13):2115-2123.

CHABNER BA & FOJO A (1989). Multidrug resistance: P-glycoprotein and its allies-the elusive foes. *J Natl Cancer Inst*, 81:910-913.

CHAMBERS TC, McAVOY EM, JACOBS JW & EILON G (1990). Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J Biol Chem*, 265:7679-7686.

CHANDHARY PM & RONINSON IB (1991). Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*, 66:85-94.

CHATTERJEE M & HARRIS AL (1990). Reversal of acquired resistance to adriamycin in CHO cells by tamoxifen and 4-hydroxy tamoxifen: role of drug interaction with alpha-1 acid glycoprotein. *Br J Cancer*, 62:712-717.

CHATTERJEE M, ROBSON CN & HARRIS AL (1990). Reversal of multidrug resistance by verapamil and modulation by α 1-acid glycoprotein in wild-type and multidrug-resistant chinese hamster ovary cell lines. *Cancer Res*, 50:2818-2822.

CHOI K, CHEN C-J, KRIEGLER M & RONINSON IB (1988). An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell*, 53:519-529.

CHOW K-C & ROSS WE (1987). Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 7:3119-3123.

CHUNG TD, DRAKE FH, TAN KB, PER SR, CROOKE ST & MIRABELLI CK (1989). Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding 2 human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:9431-9435.

CORDON-CARDO C, O'BRIEN JP, BOCCIA J, CASALS D, BERTINO JR & MELAMED MR (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem*, 38:1277-1287.

EASTMAN A (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther*, 34:155-166.

EASTMAN A & SCULTE N (1988). Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diammine-dichloro-platinum(II). *Biochemistry*, 27:4730-4734.

ENDICOTT JA & LING V (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*, 58:137-171.

FOJO A, AKIYAMA S, GOTTESMAN MM & PASTAN I (1985). Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 45:3002-3007.

FOJO AT (1991). Multidrug resistance. *Adv Intern Med*, 36:195-218.

FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMAN MM & PASTAN I (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:265-269.

FOOTE SJ, THOMPSON JK, COWMAN AF & KEMP DJ (1989). Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P falciparum*. *Cell*, 57:921-930.

FORD JM & HAIT WN (1990). Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev*, 42:155-199.

GALVEZ J, DE LA CRUZ JP, ZARZUELO A, SANCHEZ DE MEDINA F, JIMENEZ J & SANCHEZ DE LA CUESTA F (1994). Oral administration of quercitrin modifies intestinal oxidative status of rats. *Gen Pharmac*, 25(6):1237-1243.

GEKELER V, FRESE G, DIDDENS H & PROBST H (1988). Expression of a P-glycoprotein gene is inducible in a multidrug resistant human leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 155(2):754-760.

GOLDIE JH & COLDMAN AJ (1983). Quantitative model for multiple levels of drug resistance in tumors. *Cancer Treat Rep*, 67:923.

GOLDSTEIN LJ, FOJO AT, UEDA K, CRIST W, GREEN A, BRODEUR G, PASTAN I & GOTTESMAN MM (1990). Expression of the multidrug resistance, *mdr1*, gene in neuroblastomas. *J Clin Oncol*, 8:128-136.

GOLDSTEIN LJ, GALSKI H, FOJO A, WILLINGHAN M, LAI S-L, GAZDAR A, et al (1989). Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 81:116-131.

GONZALEZ FERNANDEZ FA, PEREZ CALVO J y GARCIA DIAZ C (1992). Quimioterapia en hematología. *Medicine*, 6(13):576-586.

GOODMAN GE, YEN YP, COX TC & CROWLEY J (1987). Effect of verapamil on in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res*, 47:2295-2304.

GRIFFITHS B (1986). Scaling-up of animal cell cultures. In "Animal cell culture: a practical approach" (Freshney RI, Ed). IRL Press. Oxford, 33-69.

GROS P, CROOP J & HOUSMAN D (1986). Mammalian drug resistance gene: complete cDNA sequence indicates a strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, 47:371-380.

HAIT WN & AFTAB DT (1992). Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance. *Biochem Pharmacol*, 43(1):103-107.

HAMADA H, HAGIWARA K-I, NAKAJIMA T & TSURUO T (1987). Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cell: effects of verapamil, trifluoperazine and phorbol esters. *Cancer Res*, 47:2860-2865.

HARRIS AL (1985). DNA repair: relationship to drug and radiation resistance, metastasis and growth factors. *Int J Radiat Biol*, 48:675-690.

HARRIS AL & HOCHHAUSER D (1992). Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncologica*, 31(2):205-213.

HAY RJ (1986). Preservation and characterisation. In "Animal cell culture: a practical approach" (Freshney RI, Ed). IRL Press. Oxford, 71-112.

HECK MMS, HITTELMAN WN & EARNSHAW WL (1989). In vivo phosphorylation of the 170-kDa form of eukaryotic DNA topoisomerase II. *J Biol Chem*, 264:15161-15164.

HEGMANN EJ, SHEEHAN CL, BANER HC & KERBEL RS (1992). Brain microvascular endothelial cells express in vitro P-glycoprotein activity: functional studies. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 33:480.

HEIN R, LANDTHALER M, HAINA D & KRIEG T (1992). Laser light of low power density does not influence chemotaxis and collagen synthesis of human dermal fibroblasts. *Lasers Med Sci*, 7:79-83.

HÖLLT V, KOUBA M, DIETEL M & VOGT G (1992). Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally

effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*, 43:2601-2608.

HUFF AC, WARD RE & KREUZER KN (1990). Mutational alteration of the breakage/resealing subunit of bacteriophage T4 topoisomerase confers resistance to antitumour agent m-AMSA. *Mol Gen Genet*, 221:27-32.

INABA M, KOBAYASHI H, SAKURAI Y & JOHNSON RK (1979). Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res*, 39:2200-2203.

JOHNSON SW, OZOLS RF & HAMILTON TC (1993). Mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *Cancer*, 71:644-649.

JONGSMA APM, SPENGLER BA, VAN DER BLIEK AM, BORST P & BIEDLER JL (1987). Chromosomal localization of three genes coamplified in the multidrug-resistant CH^RC5 chinese hamster ovary cell line. *Cancer Res*, 47:2875-2878.

JURANKA PF, ZASTAWNY RL & LING V (1989). P-glycoprotein: multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *Faseb J*, 3(14):2583-2592.

KARTNER N, EVERNDEN-PORELLE D, BRADLEY G & LING V (1985). Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 316:820-823.

KARTNER N, RIORDAN JR & LING V (1983a). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221:1285-1288.

KARTNER N, SHALES M, RIORDAN JR & LING V (1983b). Daunorubicin-resistant chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res*, 43:4413-4419.

KAYE SB (1988). The multidrug resistance phenotype. *Br J Cancer*, 58:691-694.

KIMURA H, YONEMURA Y & EPSTEIN AL (1991). Flow cytometric quantification of the proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in advanced gastric cancers. *Cancer*, 68:2175-2180.

KIRSCHNER LS, GREENBERGER LM, HONG HSU SI, HUANG YANG CP, COHEN D, PIEKARZ RL, CASTILLO G, HAN EK-H, YU L & HORWITZ SB (1992). Biochemical and genetic characterization of the multidrug resistance phenotype in murine macrophage-like J774.2 cells. *Biochem Pharmacol*, 43:77-87.

KOMIYAMA S, MATSUI K, KUDOH S, NOGAE I, KURATOMI Y, SABURI Y, ASOH KI, KOHNO K & KUWANO M (1989). Establishment of tumor cell lines from a patient with head and neck cancer and their different sensitivities to anti-cancer agents. *Cancer*, 63:675-681.

KOPNIN BP (1981). Specific karyotypic alterations in colchicine-resistant cells. *Cytogenet Cell Genet*, 30:11-14.

KRUPINSKI J, COUSSEN F, BAKALYAR HA, TANG W-J, FEINSTEIN PG, ORTH, et al (1989). Adenyl cyclase amino acid sequence: possible channel-or transporter-like structure. *Science*, 244:1558-1564.

LaQUAGLIA MP, KOPP EB, SPENGLER BA, MEYERS MB & BIEDLER JL (1991). Multidrug resistance in human neuroblastoma cells. *J Pediatric Surgery*, 26(9):1107-1112.

LEMONTT JF, AZZARIA M & GROS P (1988). Increased mdr gene expression and decreased drug accumulation in multidrug-resistant human melanoma cells. *Cancer Res*, 48:6348-6353.

LEWIS AD, DURAN GE, LAN DH-M & SIKIC BI (1992). Sensitization of drug resistant human ovarian cancer cells to cyanomorpholino doxorubicin (MRA-CN) by modulation of glutathione metabolism. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 22(4):821-824.

LEWIS AD, HAYES JD & WOLF CR (1988). Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the

onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis*, 9:1283-1287.

LEWIS AD, HICKSON ID, ROBSON CN, HARRIS AL, HAYES JD & WOLF CR (1988). Elevated expression of an alpha class Yc-containing glutathione S-transferase and glutamyl-transpeptidase in a CHO cell line resistant to bifunctional nitrogen mustards. *Proc Natl Acad Sci USA*, 22:8511-8516.

LING V & THOMPSON LH (1973). Reduced permeability in chinese hamster ovary cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol*, 83:103-116.

LIU LF (1989). Topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Ann Rev Biochem*, 58:351-375.

LOOR F, BOESCH D, GAVERIAUX C, JACHEZ B, DOURTIER-MANZANEDO A & EMMER G (1992). SDZ 280-446, a novel semisynthetic cyclopeptide: in vitro and in vivo circumvention of P-glycoprotein mediated tumor cell multidrug resistance. *Br J Cancer*, 65:11-18.

LUM BL, FISHER GA, BROPHY NA, YAHANDA AM, ADLER KM, KAUBISCH S, HALSEY J & SIKIC BI (1993). Clinical trials of modulation of multidrug resistance, pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer*, 72:3502-3514.

MA DDF, DAVEY RA, HARMAN DH, ISBISTER JP, SCURR RD, MACKERTICH SM, DOWDEN G & BELL DR (1987). Detection of a multidrug resistant phenotype in acute non-lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 1:135-137.

MA L, MARQUARDT D, TAKEMOTO L & CENTER MS (1991). Analysis of P-glycoprotein phosphorylation in HL60 cells isolated for resistance to vincristine. *J Biol Chem*, 266:5593-5599.

MARIE JP (1992). Los gènes de résistance à la chimiothérapie. *La Presse Médicale*, 21:1033-1037.

MARX E, MUELLER-KLIESER W & VANPEL P (1988). Lactate-induced inhibition of tumor cell proliferation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 14(5):947-955.

MASTERS JR (1990). Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiotherapy and oncology*, 19:297-305.

MASUDA H, OZOLS RF, LAI GM, FOJO A, ROTHENBERG M & HAMILTON TC (1988). Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diammine-dichloro-platinum(II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 48:5713-5716.

MAYER A, TAKIMOTO M, FRITZ E, SCHELLANDER G, KOFLER K & LUDWIG H (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer*, 71:2454-2460.

McGRATH JP & VARSHAVSKY A (1989). The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistant P-glycoprotein. *Nature*, 340:400-404.

McGUIRE WP (1992). Experimental chemotherapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 6(4):927-940.

MECHETNER EB & RONINSON IB (1992). Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5824-5828.

MEHTA BM, ROSA E, FISSEKIS JD, BADING JR, BIEDLER JL & LARSON SM (1992). In-vivo identification of tumor multidrug resistance with tritium-3-colchicine. *J Nucl Med*, 33:1373-1377.

MEYERS MB (1989). Protein phosphorylation in multidrug resistant chinese hamster cells. *Cancer Commun*, 1:233-241.

MILLER TP, GROGAN TM, DALTON WS, SPIER CM, SCHEPER RJ & SALMON SE (1991). P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol*, 9:17-24.

MISTRY P, KELLAND L, ABEL G, SIDHAR S & HARRAP K (1991). The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 64:215-220.

MITSUHASHI Y, INABA M, SUGIYAMA Y & KOBAYASHI T (1992). In vitro measurement of chemosensitivity of human small cell lung and gastric cancer cell lines toward cell cycle phase-nonspecific agents under the clinically equivalent area under the curve. *Cancer*, 70:2540-2546.

MORALES JA, RUIZ-GOMEZ MJ, GIL-CARMONA L, SOUVIRON A & MARTINEZ-MORILLO M (1995). He-Ne laser has no effect on cell cycle phases of human colon adenocarcinoma cells. *Rev esp Fisiol (J Physiol Biochem)*, 51(1):43-48.

MORROW CS & COWAN KH (1990). Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells*, 1:15-22.

MOSCOW JA & COWAN KH (1988). Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst*, 80:14-20.

NEALE ML & MATTHEWS (1989). Development of tumour cell resistance to tumour necrosis factor does not confer resistance to cytotoxic drugs. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25(1):133-137.

NIEHANS GA, JASZCZ W, BRUNETTO V, PERRI RT, GAJL-PECZALSKA K, WICK MR, TSURUO T & BLOOMFIELD CD (1992). Immunohistochemical identification of P-glycoprotein in previously untreated, diffuse large cell and immunoblastic lymphomas. *Cancer Res*, 52:3768-3775.

NOONAN KE, BECK C, HOLZMAYER TA, CHIN JE, WUNDER JS, ANDRULIS IL, GAZDAR AF, WILLMAN CL, GRIFFITH B, VON HOFF DD & RONINSON IB (1990). Quantitative analysis of mdr1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:7160-7164.

NYGREN P & LARSSON R (1990). Verapamil and cyclosporin A sensitize human kidney tumor cells to vincristine in absence of membrane P-glycoprotein and without apparent changes in the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. *Bioscience Reports*, 10(2):231-237.

OZOLS RF (1992). Chemotherapy for advanced epithelial ovarian cancer. *Hematology/Oncology clinics of North America*, 6(4):879-893.

PASTAN I & GOTTESSMAN MM (1992). Multidrug resistance. *Annu Rev Med*, 42:277-286.

PEREZ RP, HAMILTON TC, OZOLS RF & YOUNG RC (1993). Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer*, 71:1571-1580.

PICKETT CB & LU AY (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Ann Rev Biochem*, 58:743-764.

PIRKER R, KEILHAUER G, RASCHACK M, LECHNER C & LUDWIG H (1990). Reversal of multi-drug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil. *Int J Cancer*, 45:916-919.

PIZARRO A, PINILLA J y BERROCAL A (1992). Citometría de flujo. *Piel*, 7:367-372.

QIAN X-D & BECK WT (1990). Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts. *J Biol Chem*, 265:18753-18756.

RANKIN EM & KAYE SB (1990). Principles of chemotherapy. In "Treatment of cancer" (Sikora K & Halnan KE, Ed). Chapman and Hall Medical. London, 127-145.

REEVE JG, WRIGHT KA, RABBITTS PH, TWENTYMAN PR & KOCH G (1989). Collateral resistance to verapamil in multidrug resistant mouse tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 81:1588.

RIORDAN JR & LING V (1985). Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol Ther*, 28:51-75.

RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM BS, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, et al (1990). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245:1066-1073.

ROBINSON MJ & OSHEROFF N (1990). Stabilisation of the topoisomerase II-DNA cleavage complex by antineoplastic drugs: inhibition of enzyme-mediated DNA religation by 4'(9'acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide. *Biochemistry*, 29:2511-2515.

RONINSON IB (1992). The role of the MDR1 (P-Glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*, 43(1):95-102.

SAFA AR, STERN RK, CHOI K, AGRESTI M, TAMAI I, MEHTA ND & RONINSON IB (1990). Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by Gly-185 to Val-185 substitution in P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:7225-7229.

SCANLON K, KASHANI-SABET M & SOWERS L (1989). Overexpression of DNA replication and repair enzymes in cisplatin-resistant human colon carcinoma HCT8 cells and circumvention by azidothymidina. *Cancer Commun*, 1:269-275.

SCHIMKE RT (1986). Methotrexate resistance and gene amplification, mechanisms and implications. *Cancer*, 57(10):1912-1917.

SCHINKEL AH, ROELOFS MEM & BORST P (1991). Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 51:2628-2635.

SCHNEIDER J, EFFERTH T, KAUFMANN M, MATIA JC, MATTERN J, RODRIGUEZ-ESCUADERO EJ, et al (1990). Expression of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in gynecological tumors. *Cancer*, 3:202-205.

SCHWACHÖFER JHM, CROOIJMANS RPMA, VAN GASTEREN JJM, HOOGENHOUT J, JERUSALEM CR, KAL HB & THEEUWES AGM (1989). Repair of sublethal damage in two human tumor cell lines grown as multicellular spheroids. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 17(3):591-595.

SEVIN BU, PERRAS JP, AVERETTE HE, DONATO DM & PEÑALVER M (1993). Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer*, 71:1613-1620.

SHEN D-W, FOJO A, RONINSON IB, CHIN JE, SOFFIR R, PASTANI I & GOTTESMAN MM (1986). Multidrug resistance in DNA mediated transformants is linked to transfer of the human *mdr1* gene. *Mol Cell Biol*, 6:4039-4045.

SKIPPER HE, SCHABEL FM & WALCOX WS (1964). Experimental evaluation of potential anticancer agents XII. On the criteria and kinetics associated with <<curability>> of experimental leukemia. *Cancer Chemother Rep*, 35:1.

SLATER LM, SWEET P, STUPECKY M & GUPTA S (1986). Cyclosporin A corrects daunorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma. *Br J Cancer*, 54:235-238.

SLOVAK ML, COCCIA M, MELTZER PS & TRENT JM (1991). Molecular analysis of two human doxorubicin-resistant cell lines: evidence for differing multidrug resistance mechanisms. *Anticancer Res*, 11: 423-428.

SONNEVELD P, DURIE BG, LOKHORST HM, MARIE IP, SOLBU G, SUCIN S, ZITTOUN R, LÖWENBERG B & NOOTER K (1992). Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by ciclosporin. *The Lancet*, 340:255-259.

STAATS J, MARQUARDT D & CENTER MJ (1990). Characterization of a membrane-associated protein kinase of multidrug-resistant HL60 cells which phosphorylates P-glycoprotein. *J Biol Chem*, 265:4084-4090.

STEWART DJ & EVANS WK (1989). Non-chemotherapeutic agents that potentiate chemotherapy efficiency. *Cancer Treat Rev*, 16:1-40.

SUGAWARA I, HAMADA H, NAKAJAMA M, OKAMOTO S, TSURUO T & MORI S (1989). Further characterization of the human adrenal-derived P-glycoprotein recognized by monoclonal antibody MRK16 reacting with only human P-glycoprotein. *Jpn J Cancer Res*, 80(12):1199-1205.

TAN KB, MATTERN MR, ENG W-K, McCABE FL & JOHNSON RK (1989). Non-productive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors. *JNCI*, 81:1732-1735.

THORGEIRSSON SS, HUBER BE, SORELL S, FOJO A, PASTAN I & GOTTESMAN MM (1987). Expression of the multidrug resistance gene in hepatocarcinogenesis and regenerating rat liver. *Science*, 236:1120-1122.

TSURUO T, LIDA H, TSUKAGOSHI S & SAKURAI Y (1982). 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.

TWENTYMAN PR, REEVE JG, KOCH G & WRIGHT KA (1990a). Chemosensitisation by verapamil and cyclosporin A in mouse tumor cells expressing different levels of P-glycoprotein and CP22 (sorcini). *Br J Cancer*, 62:89-95.

TWENTYMAN PR, WRIGHT KA & FOX NE (1990b). Characterization of a mouse tumour cell line with in vitro derived resistance to verapamil. *Br J Cancer*, 61:279-284.

VAN DAM PA, WATSON JV, LOWE DG & SHEPHERD JH (1992). Flow Cytometric measurement of cell components other than DNA: virtues, limitations and applications in gynecologic oncology. *Obstet Gynecol*, 79:616-621.

VAN DER VALK P, VAN KAL KEN C, KETELAARS H, BROXTERMAN HJ, SCHEFFER G, KUIPER CM, et al (1990). Distribution of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic tissues. *Ann Oncol*, 1:56-64.

VOLM M, BAK M, EFFERTH T & MATTERN J (1988). Induced multidrug-resistance in murine sarcoma 180 cells grown in vitro and in vivo and associated changes in expression of multidrug-resistance DNA-sequences and membrane glycoproteins. *Anticancer Res*, 8:1169-1178.

VOLM M, MATTERN J & SAMSEL B (1992). Relationship of inherent resistance to doxorubicin, proliferative activity and expression of P-glycoprotein 170, and glutathione S-transferase- π in human lung tumors. *Cancer*, 70:764-769.

WANG JC (1985). DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem*, 54: 664-697.

WARHOLM M, GUTHENBERG C, VON BAHR C & MANNERVIK B (1985). Glutathione transferases from human liver. *Meth Enzymol*, 113:499-503.

WARR JR, ANDERSON M & FERGUSON J (1988). Properties of verapamil-hypersensitive multidrug-resistant chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, 48:4477-4483.

WEBER J, SCHEID W & TRAUT H (1989). Enhancement of bleomycin-induced DNA damage by exposing DNA to high concentrations of the calcium antagonist verapamil. *Drug Res*, 39(II):1550-1554.

WEINSTEIN RS, JAKATE SM, DOMINGUEZ JM, LEBOWITZ MD, KOUKOULIS GK, KUSZAK JR, KLUSKEUS LF, GROGAN TM, SACLARIDES TJ, RONINSON IB & COON JS (1991). Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res*, 51:2720-2726.

WEINSTEIN RS, KUSZAK JR, KLUSKEUS LF & COON JS (1990). P-glycoprotein in pathology: the multidrug resistance gene family in humans. *Hum Pathol*, 21:34-48.

WILLINGHAM MC, CORNWELL MM, CARDARELLI CO, GOTTESMAN MM & PASTAN I (1986). Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res*, 46:5941-5946.

WILSON AP (1986). Cytotoxicity and viability assays. In "Animal cell culture: a practical approach" (Freshney RI, Ed). IRL Press. Oxford, 183-216.

WOLF CR, LEWIS AD, CARMICHAEL J, ADAMS DJ, ALLAN SG & ANSELL DJ (1987). The role of glutathione in determining the response of normal and tumor cells to anticancer drugs. *Biochem Soc Trans*, 15:728-730.

WOODCOCK BG, ABDEL-RAHMAN MS, WOSCH F & HARDER S (1993). Effect of D,L-verapamil, verapamil enantiomers and verapamil metabolites on the binding of vincristine to α_1 -acid glycoprotein. *Eur J Cancer*, 29A(4):559-561.

YOUNG R (1990). Mechanisms to improve chemotherapy effectiveness. *Cancer*, 65:815-822.