

(043)"1997"cal

Departament de Medicina

Universitat de Lleida



Universitat
Registr

10 NOV. 1997

E: 6794

S:

**RESISTENCIA MULTIPLE A DROGAS. ESTUDIO IN
VITRO DEL EFECTO MODULADOR DE PSC 833 Y
TAMOXIFEN EN UN MODELO EXPERIMENTAL**



4.-ESTUDIO DE MODULACION CON SDZ PSC 833

4.1.- Estudio de diferentes concentraciones

En la siguientes tablas y gráficas se muestran los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3-*mdr1* en relación con las diferentes concentraciones de PSC 833, en varios experimentos de incorporación y expulsión. Se muestran también los valores en las células 3T3 sin modulador (nivel de referencia para valorar la capacidad moduladora de PSC 833).

Así mismo se muestran los valores de los experimentos realizados en paralelo con VRP 10 μ M, que sirve de control positivo de modulación. (La notación MDR hace referencia a las células 3T3-*mdr1*). En la primera tabla se muestran los valores del experimento con PSC 833 a concentraciones finales de 5 μ M, 10 μ M y 50 μ M (solución madre: 840 μ M).

	Incorporación DNR					Expulsión DNR			
	Basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
3T3	107	149	3624	6020	6338	5676	5254	5071	4473
3T3 VRP 10 μ M	107	124	2712	5947	6739	6537	5868	5217	5043
MDR	107	140	632	927	1117	471	432	284	288
MDR VRP 10 μ M	107	200	4762	8345	8889	7235	6353	5611	5360
MDR PSC 5 μ M	107	261	5890	9628	10030	9736	8725	7568	7293
MDR PSC 10 μ M	107	196	5748	9456	9833	9316	8461	7416	6962
MDR PSC 50 μ M	107	184	5295	9386	9957	9119	7723	6566	6244

Tabla 17: Resultados del experimento de valoración de concentración óptima de PSC 833

En la siguiente tabla y gráfica se muestran los valores de experimentos realizados con PSC 833 a concentraciones de 1 μ M, 0.5 μ M, 0.2 μ M y 0.1 μ M.

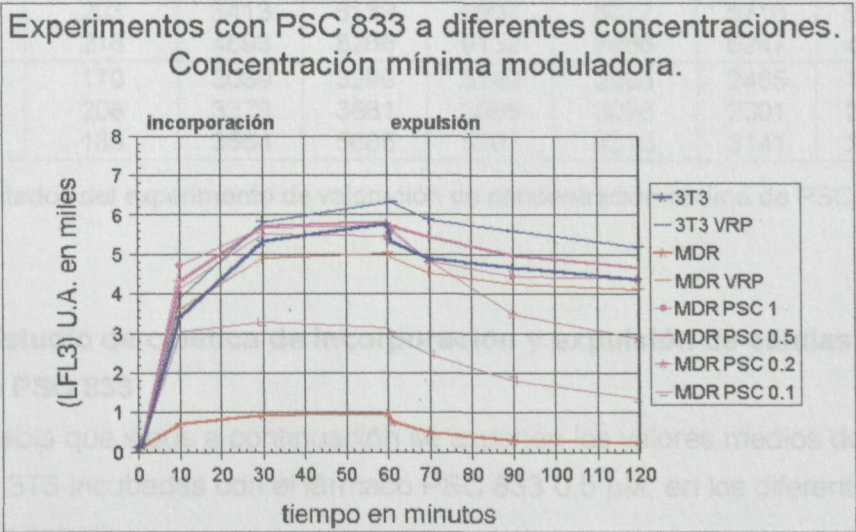


Figura 11: Se muestran las curvas de cinética de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* tras la incubación con PSC 833 a diferentes concentraciones.

	Incorporación DNR					Expulsión DNR			
	Basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
3T3	106	174	3387	5320	5772	5313	4878	4654	4372
	107	168	3607	6554	7232	6447	5753	5481	5301
	107	240	5198	8924	10690	9515	7267	5538	5194
3T3	106	142	3880	5827	6306	6323	5873	5581	5187
VRP	108	152	3681	7084	8208	8126	7744	7136	6792
10 μ M	107	215	5542	10180	12440	12640	11460	9346	8813
3T3	106	180	5334	6983	7338	7156	6336	5897	5506
PSC	108	199	5011	8628	9437	9228	8425	7739	7224
1 μ M	107	354	7870	11660	12820	11900	9252	6467	6985
3T3	106	202	4495	6694	7161	6959	6485	6141	5743
PSC	107	230	4552	7998	8745	8622	8001	7985	7336
0.5 μ M	107	261	6525	11020	12930	12280	10460	7832	7605
3T3	107	159	4410	8260	9260	9183	8650	8181	7699
PSC	107	188	4637	6343	7062	7043	6567	6205	5724
0.2 μ M	107	254	6485	11400	13520	13090	11280	8680	8162
3T3	107	178	4361	8149	9235	8926	8407	7797	7359
PSC	106	156	4073	6165	6485	6456	5865	5781	5298
0.1 μ M	107	240	5940	10660	12430	11670	9264	5668	4830
MDR	106	138	709	923	976	758	486	291	248
	108	189	596	927	946	623	430	300	231
	107	165	760	1118	1307	626	291	185	171
MDR	107	184	3619	4898	5024	4902	4524	4250	4116
VRP	108	192	3171	5742	6442	6324	5644	5189	5056
10 μ M	107	218	4626	8551	10370	8678	7314	5850	5777
MDR	107	276	4712	5679	5733	5578	4834	4441	4375
PSC	108	284	4179	6461	6779	6503	5702	5328	5189
1 μ M	107	330	6669	10500	11400	9987	7856	5901	5244
MDR	107	253	4308	5700	5814	5710	5431	4965	4656
PSC	108	280	4299	5640	5997	5810	5664	5140	4879
0.5 μ M	107	222	5048	9085	10660	9580	7676	6444	6242
MDR	107	223	4143	5516	5462	5612	4814	3483	2880
PSC	108	203	3413	6139	6607	6377	5716	5218	4917
0.2 μ M	107	218	4893	8266	9132	7866	6247	4914	4565
MDR	107	170	3039	3299	3149	2925	2465	1799	1374
PSC	108	208	3373	3881	3995	3078	2301	2045	1588
0.1 μ M	107	185	3564	5685	5707	4313	3141	2087	2021

Tabla 18: Resultados del experimento de valoración de concentración óptima de PSC 833

4.2.- Estudio de cinética de incorporación y expulsión de células 3T3 en presencia de PSC 833

En la tabla que sigue a continuación se exponen los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3 incubadas con el fármaco PSC 833 0.5 μ M, en los diferentes tiempos y condiciones de estudio:

exp	incorporación (3T3 / PSC 0.5 μ M)					expulsión (3T3 / PSC 0.5 μ M)			
	basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
1	106	132	6303	7697	7573	6649	6591	5745	4754
2	106	123	5942	7730	8061	7626	5712	5264	4447
3	107	151	5340	7062	7139	7313	5871	4673	3997
4	107	148	5542	7103	7024	7357	6081	4865	4093
5	106	144	5572	7160	7168	7567	6028	4867	4078
6	107	164	5701	7492	7773	7709	6104	5071	4221
7	107	153	5047	8712	9973	9626	8561	7540	7124
8	108	193	5077	8837	10380	9849	8602	7584	7076
9	107	317	5118	6757	7219	6942	5803	5288	5124
10	107	154	5079	6882	7423	7294	6103	5667	5410
11	106	165	5168	6103	8684	8400	7429	6293	5736
12	106	170	5086	7590	8618	8098	6653	6196	5682
13	106	203	5067	7333	8068	7408	6284	5340	4939
14	106	202	4495	6694	7161	6959	6485	6141	5743

Tabla 19: Resultados de incorporación y expulsión de las células 3T3 con PSC 833

4.3.- Estudio de cinética de incorporación y expulsión de células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833

En la siguiente tabla se exponen los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0.5 μ M, en los diferentes tiempos y condiciones de estudio:

exp	incorporación (3T3- <i>mdr1</i> / PSC 0.5 μ M)					expulsión (3T3- <i>mdr1</i> / PSC 0.5 μ M)			
	basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
1	106	162	7043	8046	7771	6505	4047	2784	1616
2	106	146	5652	6455	7253	6487	3139	2780	1865
3	107	212	6002	7551	7311	7074	5219	4128	3095
4	107	207	5859	7077	6937	6338	4824	3687	2625
5	107	190	6055	7167	6619	6582	5065	3920	2761
6	107	190	6147	7010	6265	6133	4695	3539	2477
7	106	280	5130	8406	9586	9032	7672	6998	6373
8	107	189	5334	8619	9795	9264	8122	7139	6483
9	106	157	4411	6187	6744	6557	5443	4901	4583
10	106	179	4075	5980	6488	6407	5235	4632	4257
11	107	148	4817	6841	6956	6699	6258	5535	4675
12	107	157	4968	6766	6982	6767	6404	5495	4714
13	106	175	4228	6127	6372	6012	5064	4127	3676
14	107	253	4308	5700	5814	5710	5431	4965	4656

Tabla 20: Resultados de incorporación y expulsión en las células 3T3-*mdr1* con PSC 833

En la siguiente gráfica se muestran las curvas de incorporación y expulsión en las células 3T3 y las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0.5 μ M, construidas a partir de los valores de las tablas:

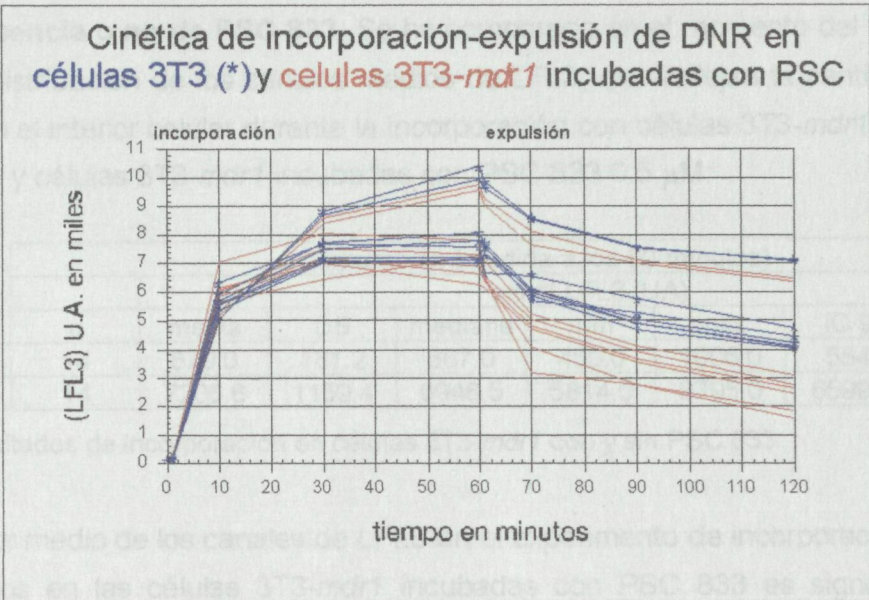


Figura 12: En esta figura se muestran las curvas de las cinéticas de incorporación y expulsión de DNR en las células sensibles y resistentes tras la incubación con PSC 833.

4.4.- Resultados de los experimentos de incorporación

4.4.1.- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3 en presencia o no de PSC 833. Se ha comparado en el momento del equilibrio (60 minutos) la distribución de los canales medios de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR acumulada en el interior celular durante la incorporación en células 3T3 en ausencia de modulador y células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0.5 μ M.

Tipo celular	n	incorporación (medida a los 60 minutos)					
		canal LFL3 (UA)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	14	7740.2	1235.0	7454.0	5772.0	10140.0	7093.22-8387.18
3T3+PSC	14	8018.8	1062.5	7673.0	7024.0	10380.0	7462.3-8575.3

Tabla 21: Resultados de incorporación en células 3T3 con y sin PSC 833

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos en las células 3T3 incubadas con PSC 833 no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ($p=0.5280$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 278.6 UA y el IC 95 % de la diferencia es de - 616.6 a 1173.9 UA. Es decir, la incubación de las células 3T3 con PSC 833 no produce variaciones significativas en el acumulo de DNR en las células sensibles.

4.4.2.- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3-*mdr1* en presencia o no de PSC 833. Se ha comparado en el momento del equilibrio (60 minutos), la distribución de los canales medios de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR acumulada en el interior celular durante la incorporación con células 3T3-*mdr1* en ausencia de modulador y células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0.5 μ M:

Tipo celular	incorporación (medida a los 60 minutos)						
	canal LFL3 (UA)						
	n	media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
MDR	14	679.0	181.2	667.0	450.0	1006.0	584.05-773.95
MDR+PSC	14	7206.6	1159.4	6946.5	5814.0	9795.0	6599.23-7813.97

Tabla 22: Resultados de incorporación en células 3T3-*mdr1* con y sin PSC 833

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1* sin modulador ($p<0.0850$). La diferencia media es de 6527.6 UA, y el IC 95 % de la diferencia es de 5854.7 a 7200.4 UA. Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con PSC 833 consigue aumentar la cantidad de fluorescencia intracelular, y por tanto la concentración de DNR, de forma significativamente diferente a los niveles alcanzados por las mismas células sin modulador.

4.4.3.- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3 en ausencia de modulador y las células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833. Se ha comparado en el momento del equilibrio, la distribución media de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR acumulada en el interior celular durante la incorporación, con células 3T3 en ausencia de modulador y células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0.5 μ M:

Tipo celular	incorporación (medida a los 60 minutos)						
	canal LFL3 (UA)						
	n	media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	14	7740.2	1235.0	7454.0	5772.0	10140.0	7093.22-8387.18
MDR+PSC	14	7206.6	1159.4	6946.5	5814.0	9795.0	6599.23-7813.97

Tabla 23: Resultados de incorporación en células 3T3 y 3T3-*mdr* con PSC 833

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ($p=0.2490$). La diferencia media de LFL3 es de 533.6 UA, y el IC 95% de la diferencia es de -973.0 a 1464.4 UA. Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con PSC 833 consigue aumentar la cantidad de fluorescencia intracelular, y por tanto la concentración de DNR, hasta niveles similares a

los alcanzados por las células 3T3 sin modulador (parámetro considerado por nosotros para considerar una modulación completa del fenómeno MDR).

4.4.4.- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833 y en presencia de VRP. Se ha comparado en el momento del equilibrio, la distribución de los canales medios de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR acumulada en el interior celular durante la incorporación con células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833 0.5 μ M y el mismo tipo celular en presencia de VRP 10 μ M:

Tipo celular	n	incorporación (medida a los 60 minutos)					
		canal LFL3 (UA)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
MDR+VRP	14	7362.5	1100.4	7331.5	5024.0	9429.0	6785.5-7938.44
MDR+PSC	14	7206.6	1159.4	6946.5	5814.0	9795.0	6599.23-7813.97

Tabla 24: Resultados de incorporación en células 3T3-*mdr1* con VRP y con PSC 833

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1*+PSC 833 no es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1* con VRP ($p=0.7180$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 155.9 UA, y el IC 95 % de la diferencia es de -722.5 a 1034.2 UA. Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con PSC 833 consigue aumentar la cantidad de fluorescencia intracelular, y por tanto la concentración de DNR, hasta niveles similares a los alcanzados por las células 3T3-*mdr1* con VRP.

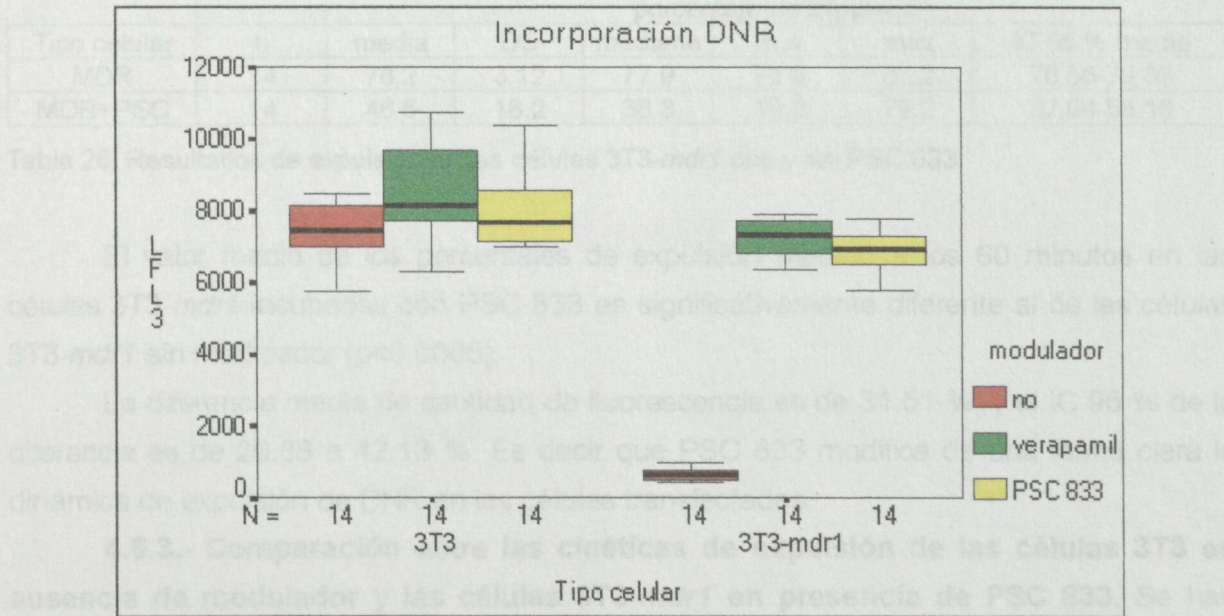


Figura 13: Diagrama de cajas de los resultados de incorporación de DNR.

4.5.- Resultados de los estudios de expulsión

4.5.1.- Comparación entre las cinéticas de expulsión de las células 3T3 en presencia o no de PSC 833. Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR entre las células 3T3 en presencia o no de PSC 833 0 5 µM

Tipo celular	expulsión(medida a los 60 minutos)						
	n	porcentaje de expulsión (%)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	14	32 0	4 98	30 3	24 2	41 6	29 39-34 60
3T3+PSC	14	35 7	7 8	35 6	19 8	45 7	31 6-39 8

Tabla 25 Resultados de expulsión en las células 3T3 con y sin PSC 833

El valor medio de los porcentajes de expulsión medido a los 60 minutos en las células 3T3 incubadas con PSC 833 no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador (p=0 1580)

La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 3 63 %, y el IC 95 % de la diferencia es de -1 52 a 8 77 % Es decir, la capacidad de expulsión de DNR de las células sensibles no se modifica en presencia de PSC 833

4.5.2.- Comparación entre las cinéticas de expulsión en las células 3T3-*mdr1* en presencia o no de PSC 833. Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR entre las células 3T3-*mdr1* en presencia o no de PSC 833 0 5 µM

Tipo celular	expulsión(medida a los 60 minutos)						
	n	porcentaje de expulsión					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
MDR	14	78 2	3 12	77 9	73 9	83 2	76 56-79 83
MDR+PSC	14	46 6	18 2	38 3	19 9	79 2	37 04-56 16

Tabla 26 Resultados de expulsión en las células 3T3-*mdr1* con y sin PSC 833

El valor medio de los porcentajes de expulsión medido a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1* sin modulador (p<0 0005)

La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 31 51 %, y el IC 95 % de la diferencia es de 20 88 a 42 13 % Es decir que PSC 833 modifica de una forma clara la dinámica de expulsión de DNR en las células transfectadas

4.5.3.- Comparación entre las cinéticas de expulsión de las células 3T3 en ausencia de modulador y las células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833. Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR entre las células 3T3 sin modulador y las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0 5 µM

Tipo celular	n	expulsión(medida a los 60 minutos)					
		Porcentaje de expulsión					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	14	32.0	4.98	30.3	24.2	41.6	29.39-34.60
MDR+PSC	14	46.6	18.2	38.3	19.9	79.2	37.04-56.16

Tabla 27: Resultados de expulsión en las células 3T3 y 3T3-mdr con PSC 833

El valor medio de los porcentajes de expulsión medido a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ($p=0.0110$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 14.59 %, y el IC 95% de la diferencia es de 3.81 a 25.39 %. Es decir, la modificación que produce PSC 833 sobre la capacidad de expulsión de DNR en las células 3T3-*mdr1* no es suficiente para asemejarse a la capacidad expulsora de DNR de las células sensibles

4.5.4.- Comparación entre las cinéticas de expulsión de las células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833 y en presencia de VRP. Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR entre las células 3T3-*mdr1* incubadas con VRP y las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 0.5 μ M:

Tipo celular	n	expulsión (medida a los 60 minutos)					
		porcentaje de expulsión					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
MDR+VRP	14	33.8	6.26	34.3	18.0	41.9	30.51-37.08
MDR+PSC	14	46.6	18.2	38.3	19.9	79.2	37.04-56.16

Tabla 28: Resultados de expulsión en las células 3T3-*mdr1* con VRP y con PSC 833

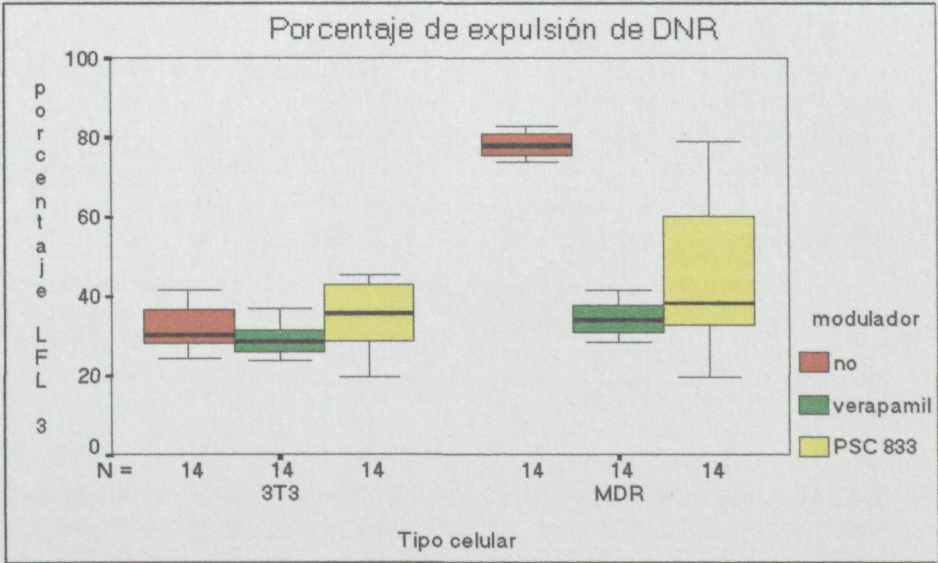


Figura 14: Diagrama de cajas de los resultados de expulsión de DNR.

El valor medio de los porcentajes de expulsión medido a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* con PSC 833 es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1* con VRP ($p=0.0250$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 12.81 % y el IC 95 % de la diferencia es de 1.86 a 23.75 %. Es decir que la incubación de las células transfectadas con PSC 833 no induce una reducción en la capacidad de expulsión de DNR en estas células similar a la que produce VRP.

5. ESTUDIO DE MODULACION CON TAMOXIFENO

5.1.- Estudio inicial para valoración de la concentración mínima de tamoxifeno con capacidad para modular P-gp 170.

En la siguiente tabla y gráfica se muestran los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3-*mdr1* en relación con el tiempo y las diferentes concentraciones de tamoxifeno (TMX), en experimentos de incorporación. Se muestran también los valores en las células 3T3 sin modulador (nivel de referencia para valorar la capacidad moduladora de TMX) y con las diferentes concentraciones de TMX. Así mismo se muestran los valores de los experimentos realizados en paralelo con VRP 10 μM , que sirven de control positivo de modulación (La notación MDR hace referencia a las células 3T3-*mdr1*).

A partir de estos resultados se evidencia que TMX a dosis de 10 y 50 μM tiene únicamente un efecto modulador parcial sobre la acción de P-gp 170. TMX a dosis más elevadas (100 μM - 200 μM) produce una alta mortalidad celular. Por otra parte se observa una reducción en la entrada de DNR en las células 3T3 en presencia de este modulador.

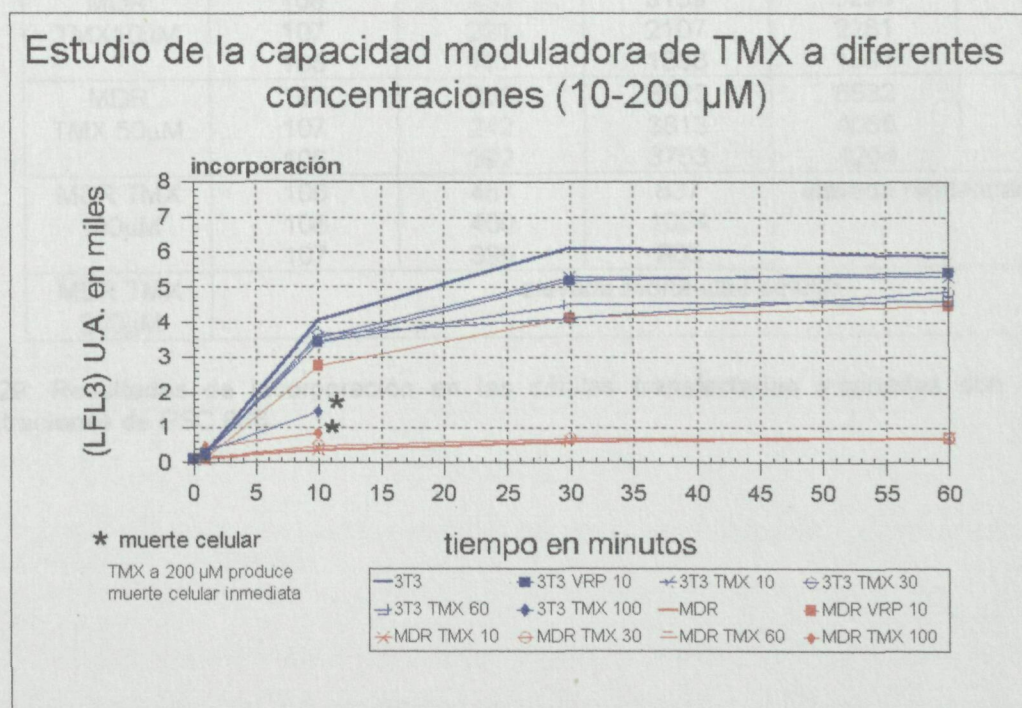


Figura 15: En la figura se muestra las curvas de cinética de incorporación de DNR en las células sensibles y resistentes tras la incubación con diferentes concentraciones de tamoxifeno.

Experimentos de incorporación (60 minutos)					
	Basal	Inmediato	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3T3	110	258	6195	10930	12200
	108	246	5653	7895	8718
	107	238	4880	6002	6988
3T3 VRP 10μM	116	309	7411	12200	13290
	107	241	5956	9028	9878
	106	245	5246	6972	7170
3T3 TMX 10μM	113	331	5457	8872	9695
	108	239	4188	5497	5916
	109	180	3080	4250	5001
3T3 TMX 50μM	109	208	3526	6206	7538
	107	240	3288	5021	5728
	107	199	2866	4322	5102
3T3 TMX 100μM	106	314	1460	Elevada mortalidad celular	
	106	299	1504		
	108	200	1656		
3T3 TMX 200μM	Elevada mortalidad celular				
MDR	108	581	1031	1277	1282
	106	132	611	811	896
	106	134	795	949	1122
MDR VRP 10μM	108	258	5714	11404	12360
	107	270	5748	7866	8180
	106	175	5651	6721	6820
MDR TMX10μM	108	230	3159	5295	5736
	107	221	2107	2281	2923
	106	137	1883	1891	2019
MDR TMX 50μM	107	206	3523	6582	7874
	107	242	3813	4056	4427
	106	392	3753	4204	4309
MDR TMX 100μM	106	457	837	elevada mortalidad celular	
	108	400	1004		
	107	396	905		
MDR TMX 200μM	elevada mortalidad celular				

Tabla 29: Resultados de incorporación en las células transfectadas incubadas con diferentes concentraciones de PSC 833

6.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA COMBINACION DE PSC 833 Y TAMOXIFENO

En la siguiente tabla se exponen los valores de los canales medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3-*mdr1* en presencia de una concentración de PSC 833 sin capacidad para modular P-gp 170 en combinación con TMX en experimentos de incorporación. Además, como control positivo de modulación se exponen los valores de este mismo tipo celular en presencia de VRP 10 μM y PSC 833 a concentración 0.5 μM (dosis que ha demostrado en nuestro experimento ser capaz de modular P-gp 170 de forma completa).

Se muestran así mismo los valores obtenidos de forma paralela en las células 3T3:

Experimentos de incorporación (60 minutos)					
	Basal	Inmediato	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3T3	110	145	3945	8610	10890
	107	130	3567	8456	10190
3T3VRP10 μM	109	184	3550	7856	9659
	107	127	2960	6798	8438
3T3PSC0.1 μM	108	196	4315	9030	10830
	107	134	3700	8099	9463
3T3PSC0.5 μM	108	177	4370	8794	10400
	107	180	4000	8874	9985
3T3TMX50 μM	108	160	2596	4577	5233
	107	121	2318	3804	4303
3T3TMX50 μM + PSC0.1 μM	108	153	2997	4985	5723
	107	130	2445	3933	4181
MDR	114	166	475	660	782
	108	117	235	339	425
MDRVRP10 μM	114	277	4978	8214	8671
	108	226	3418	7956	8790
MDRPSC0.1 μM	115	216	1573	2008	2109
	107	124	1097	1454	1709
MDRPSC0.5 μM	114	282	4849	6173	8620
	110	274	4500	5998	8456
MDRTMX50 μM	116	279	3274	4022	3730
	108	144	2070	3054	3272
MDRTMX50 μM + PSC0.5 μM	115	243	2922	4528	4390
	108	167	2368	3192	3322

Tabla 30: Resultados de incorporación en células transfectadas y sensibles incubadas con PSC 833 y TMX aislados y en combinación

A partir de los datos de la tabla anterior se demuestra que TMX a dosis de 50 μM es capaz únicamente de producir un efecto modulador parcial sobre P-gp 170. Este efecto no se ve aumentado en presencia de la combinación de ambos moduladores.

En la siguiente gráfica se muestran las curvas de las cinéticas de incorporación de las células 3T3 y 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833 y TMX a diferentes concentraciones, aislados y en combinación:

Estudio de la capacidad moduladora del uso combinado
de PSC 833 y TMX (0,1 μ M + 50 μ M)

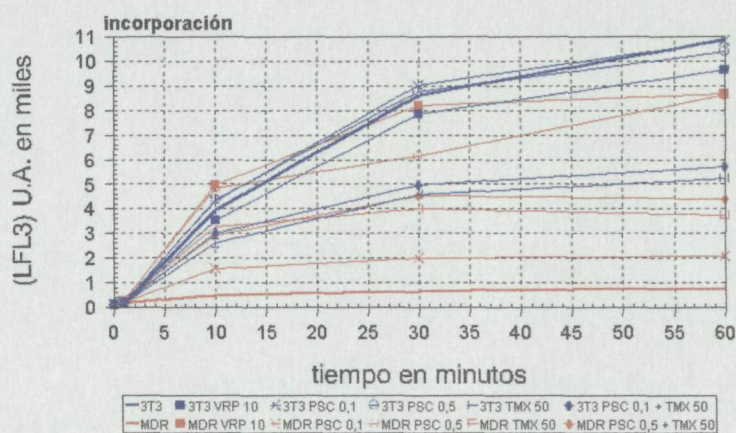


Figura 16: Se muestran las curvas de cinética de incorporación de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* tras la incubación con la combinación de PSC 833 0,1 μ M y TMX 50 μ M.

DISCUSION

VII.- DISCUSION

De los resultados del presente estudio se desprende que el modelo de laboratorio que presentamos permite realizar el estudio específico de P-gp 170, tanto cuantitativo como funcional. A través del modelo experimental desarrollado por nuestro grupo se puede estudiar la dinámica de incorporación y expulsión celular de DNR y diferenciar entre células con y sin fenotipo MDR. Para ello se ha empleado un substrato fluorescente de la bomba, como es DNR, y las lecturas se han realizado utilizando un método de medida objetivo como es la CMF. Los experimentos se han desarrollado sobre una línea celular sensible y una sublínea derivada de la primera, que ha sido transfectada con el gen *mdr1* y en la que la expresión de P-gp 170 ha sido comprobada mediante anticuerpos monoclonales específicos.

1.- METODOS DE ESTUDIO. METODO FUNCIONAL

Además de la valoración de la expresión de P-gp 170 con anticuerpos monoclonales y el estudio funcional de la misma, existen otros métodos para estudiar el fenómeno MDR a otros niveles como el nivel genético. Probablemente el método óptimo es la combinación de varios de ellos, puesto que la información que se obtiene sería muy amplia. Sin embargo, supondría la realización de diferentes pruebas de modo simultáneo, algunas de ellas muy costosas, que requieren de personal especializado y que probablemente sólo serían aplicables en investigación.

Nosotros consideramos, al igual que otros autores (van der Heyden *et al*, 1995), que el estudio funcional es el más adecuado puesto que enfoca el fenómeno MDR de una forma global. La presencia del gen *mdr1* y de la bomba en la membrana no implica con seguridad que P-gp 170 sea funcionalmente activa. Si se puede demostrar que en la membrana de las células existe una proteína funcionante, es posible inferir que todo el proceso de síntesis de dicha proteína ha sido correcto y que la molécula se expresa en una cantidad suficiente en la membrana celular para ejercer su función. Dado que el fenómeno

MDR está causado por un aumento del transporte de fármacos quimioterápicos al exterior celular, el mejor método aplicado de forma aislada para su valoración es probablemente la determinación de la concentración intracelular del fármaco en las células quimiorresistentes frente al estudio de células sensibles. La determinación exacta de la concentración intracelular de las drogas citotóxicas es un método muy complejo. Pero, es posible estimar de forma indirecta la cantidad relativa de droga acumulada en el interior celular de forma individualizada empleando fármacos fluorescentes como DNR, y procedimientos como la CMF. Con la realización de estudios funcionales se evitan los problemas de interpretación debidos a las modificaciones post-transcripcionales que pueden aparecer en las proteínas y a los movimientos, que de forma pasiva, presentan determinados fármacos a través de la membrana celular (Feller *et al*, 1995).

Una ventaja adicional de la valoración funcional del fenómeno MDR, y que no poseen el resto de técnicas de estudio, es que permite determinar si P-gp 170 puede ser funcionalmente inhibida por fármacos moduladores (van der Heyden *et al*, 1995). Observando las modificaciones en la concentración intracelular de fármacos en presencia de sustancias con supuesta capacidad para inhibir la función de P-gp 170 se puede valorar la modulación en la acción expulsora de la bomba. Por esa razón nuestro modelo permite realizar mediciones y comparaciones de la actividad moduladora entre diferentes fármacos (drogas con reconocida acción moduladora y drogas con supuesta capacidad para inhibir la acción de P-gp 170).

Por último, el hecho de que el estudio funcional de P-gp 170 pueda ser realizado a través técnicas como la CMF, la cual está cada vez más ampliamente distribuida en los centros clínicos y de investigación, y que es un método reproducible y estandarizado, permitiría el estudio generalizado del fenómeno MDR en pacientes neoplásicos e incluso podría ser considerada útil como técnica de "screening" para su aplicación en la práctica clínica (Herweijer *et al*, 1989, Gheuens *et al*, 1991, Petriz *et al*, 1997).

2.- CITOMETRIA DE FLUJO Y SUSTANCIAS FLUORESCENTES

Nuestro grupo ha decidido utilizar el método citométrico para la valoración de P-gp 170 por las ventajas enunciadas y por nuestra experiencia en este procedimiento. En los últimos años hemos aplicado estas técnicas tanto para desarrollar trabajos de investigación

como para su aplicación asistencial. La CMF se aplica en el estudio inmunofenotípico de sangre periférica y/o médula ósea en pacientes con enfermedades oncohematológicas y para la valoración de poblaciones linfocitarias en pacientes HIV positivos. Creemos que la introducción en los protocolos de rutina clínica del estudio citométrico del fenómeno MDR en pacientes neoplásicos sería una ayuda importante en la valoración clínica y terapéutica de estos enfermos.

Los primeros estudios funcionales publicados sobre P-gp 170 se desarrollaron utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia y/o sustratos marcados con isótopos radiactivos para la valoración de la capacidad expulsora de fármacos por parte de P-gp 170 (Willingham *et al*, 1989, Efferth *et al*, 1989). Estos trabajos, aunque fueron fundamentales para poner en marcha la valoración funcional del fenómeno MDR son muy laboriosos, poco estandarizables y tienen desventajas como la dificultad de cuantificación, subjetividad y necesidad de manejo de materiales radiactivos. Otras técnicas empleadas para la valoración funcional de P-gp 170 son los sistemas de análisis de imagen, basados en la medición de la diferente distribución intracelular de sustancias fluorescentes en el interior de las células que expresan MDR así como su modificación en presencia de moduladores (Hindenburg *et al*, 1989, De Lange *et al*, 1992).

La CMF es una técnica basada en el análisis celular individualizado, utilizando una suspensión celular en flujo laminar sobre la que incide un haz de luz láser que proporciona de forma rápida y objetiva información sobre el tamaño, complejidad citoplasmática, y fluorescencia de las células a estudio, utilizando colorantes fluorescentes o bien anticuerpos específicos marcados con fluorocromos (Shapiro, 1988). Ello ha propiciado que en los últimos años, haya sido el método más empleado para el estudio funcional de P-gp 170 por la mayoría de autores.

La CMF permite realizar el estudio funcional de P-gp 170 valorando el acúmulo intracelular de fármacos fluorescentes que sean sustratos de la bomba en células individualizadas, y además, permite realizar estudios en tipos celulares seleccionados de poblaciones heterogéneas así como estudios multiparamétricos.

Generalmente las sustancias fluorescentes empleadas para el estudio funcional de P-gp 170 son rodamina 123 (RH 123) y daunorubicina (DNR). RH 123 ha sido utilizada por diferentes autores con resultados satisfactorios. Efferth en trabajos para el estudio funcional de MDR en tumores humanos (Efferth *et al*, 1989). Ludescher en un estudio basado en

técnicas de CMF para el estudio de la función de P-gp 170 en LMA (Ludescher *et al*, 1992) Pétriz en un trabajo sobre líneas de leucemia humana (Pétriz and García-Lopez, 1997) Incluso en algún estudio se defiende su mayor sensibilidad en comparación con DNR (Ludescher *et al*, 1992) La mayor limitación del uso de esta sustancia en estudios funcionales es que su cinética de entrada y salida de las células también depende de potenciales de membrana mitocondrial y celular, así como de condiciones de temperatura, tiempo de incubación y concentración del fármaco (Pétriz *et al*, 1997)

DNR ha sido utilizada con éxito por autores como Herweijer en un estudio para evaluar la función de P-gp 170 y su modulación (Herweijer *et al*, 1989), Campos en un trabajo para valorar el fenómeno MDR en células de LMA (Campos *et al*, 1992), y Chin-Yee en un estudio para la validación de un ensayo citométrico para determinar la actividad de P-gp 170 (Chin-Yee *et al*, 1994)

En experimentos realizados por nuestro grupo, en un proyecto paralelo para poner a punto un procedimiento para el estudio del fenómeno MDR sobre muestras de pacientes con MM y de forma simultánea también en los primeros pasos del desarrollo de nuestro modelo experimental inicialmente utilizamos RH 123 como sustancia fluorescente (datos no publicados) Obtuvimos resultados aceptables en los estudios de incorporación y de expulsión así como en la valoración de la inhibición de P-gp 170 por VRP Una limitación del uso de RH 123 con la que nos encontramos fue su intensa fluorescencia a las dosis empleadas en nuestros estudios funcionales que obligó una elevada compensación de fluorescencia con LFL1 (canal de FITC) cuando se realizaron estudios multiparamétricos (estudio por inmunofluorescencia de la expresión de P-gp 170 con el anticuerpo 4E3) Por otra parte, en los estudios de incorporación iniciales, en los que se realizaban medidas de fluorescencia durante largos periodos de tiempo (hasta 150 minutos) se observó, a partir de los 120 minutos, la existencia de una doble cinética de incorporación de RH 123 Es decir, tras haberse llegado a un supuesto equilibrio intra-extracelular, una vez alcanzados niveles suficientes de fármaco en el interior celular, se evidenciaba un nuevo aumento en la incorporación de RH 123 Una explicación de este fenómeno puede ser por la entrada de RH 123 en las mitocondrias, reduciendo su nivel intracitoplasmático y dando lugar, por tanto, a una nueva entrada de fármaco desde el exterior celular No hemos encontrado, en otros trabajos resultados similares con el uso de RH 123, aunque algunos autores han realizado estudios durante más de 3 horas (Pétriz and García-Lopez, 1997) Quizás las diferencias en las concentraciones utilizadas, en el tipo celular empleado, (con relación a

una inferior cantidad de mitocondrias) y en el potencial membranario de las organelas y células podrían la ausencia de detección de esta “segunda cinética” añadida. Lo que sí parece cierto es que un mismo tipo celular ofrece diferentes resultados en los niveles máximos de fluorescencia alcanzados y el tiempo en que se tardan en conseguir si se emplea RH 123 en lugar de DNR. Debido a estos hechos algunos autores prefieren el uso de DNR u otros fármacos fluorescentes en lugar de RH 123.

Los experimentos que han dado lugar a esta tesis se realizaron utilizando DNR y son los que se presentan en este trabajo. A pesar de que DNR emite una fluorescencia menos intensa que RH 123, hemos obtenido con su utilización muy buenos resultados. A diferencia de RH 123, no se objetivaron interferencias en el proceso de incorporación. Además, la ventaja del uso de DNR es que permite realizar estudios multiparamétricos de expresión de antígenos y cinética de incorporación de fármacos, sin necesidad de realizar importantes compensaciones de fluorescencia ya que su espectro de emisión está suficientemente alejado del de FITC. Esta ventaja, aunque no ha sido importante en la puesta en marcha del modelo experimental básico, sí que lo es para la continuación de este estudio y para su posterior aplicación clínica. Se pretende en un futuro, realizar estudios de P-gp 170 en poblaciones concretas. Nuestro próximo objetivo es estudiar el fenómeno MDR en enfermedades oncohematológicas, que con frecuencia desarrollan resistencia al tratamiento quimioterápico y cuyas muestras tumorales son de fácil obtención. Un ejemplo es el MM, enfermedad que se diagnostica con relativa frecuencia y cuyas células tumorales son fácilmente distinguibles tanto morfológica como citométricamente. Estas células poseen una elevada expresión del antígeno de superficie CD 38 en su membrana. El estudio combinado por CMF de función de P-gp 170 y marcador de célula plasmática (CD38) permite la valoración del fenómeno de resistencia en la población tumoral, a partir de una muestra de médula ósea o sangre periférica (que presenta una gran heterogeneidad celular).

3.- LINEAS CELULARES QUIMIORRESISTENTES TRANSFECTADAS. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE P-gp 170. AUTOFLUORESCENCIA. VIABILIDAD CELULAR

Nuestra aproximación al estudio funcional de P-gp 170 se basa en la utilización de líneas celulares que han adquirido el fenotipo MDR a través de un procedimiento de

transfección. La consecuencia es que el único aspecto diferencial en la membrana de las células transfectadas es la aparición de la bomba P-gp 170 (como mecanismo al que se le pueda atribuir el fenómeno de quimiorresistencia).

En concordancia con otros autores que han utilizado este tipo de líneas celulares, nosotros opinamos que la utilización de dos líneas celulares que se diferencian únicamente en la expresión del gen *mdr1* y por tanto en la existencia de P-gp 170 en la membrana, permitiría confirmar que las diferencias encontradas tras el estudio funcional en ambos tipos de células pueden atribuirse específicamente a la acción de la bomba. Así se evitarían las interferencias que pueden aparecer como resultado del desarrollo de otros mecanismos de resistencia diferentes a P-gp 170. Esta interferencia es uno de los problemas principales de otros modelos basados en líneas celulares resistentes por pases con quimioterápicos o en células neoplásicas de pacientes tras el tratamiento quimioterápico. Además, se ha demostrado que el uso de un mismo método y en idénticas condiciones para inducir resistencia múltiple en líneas celulares "in vitro" puede dar lugar a diferentes resultados, apareciendo distintos grados de resistencia así como varios mecanismos. Este sería un mecanismo comparable a lo que puede ocurrir en la realidad clínica (Desoize *et al*, 1994).

La expresión de P-gp 170 en la membrana de las células NIH 3T3 transfectadas con el gen *mdr1* utilizadas en nuestro modelo ha sido comprobada y publicada por otros grupos de investigación (Gill *et al*, 1992; Sardini *et al*, 1994).

El estudio de la expresión de P-gp 170 se ha realizado a través de diferentes métodos como son el método de Western-Blot, inmunohistoquímica y inmunofluorescencia. Las técnicas basadas en el empleo de anticuerpos monoclonales son las más utilizadas ya que no sólo proporcionan información sobre los mecanismos de resistencia sino que también tienen un valor potencial en su aplicación clínica. Una ventaja del estudio del fenómeno MDR mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra P-gp 170 es que pueden ser empleados sobre células no viables e incluso sobre muestras de archivo.

Existen disponibles varios anticuerpos que reaccionan con diferentes zonas de la molécula de P-gp 170. Algunos reconocen antígenos intracitoplasmáticos de P-gp 170, como son JSB1 y C219, mientras otros reaccionan con epítomos externos de la glicoproteína (MRK 16, UIC2, 4E3, HYB-241, HYB-612, 15D3, 17F9 y otros) (Shi *et al*, 1995). Se sabe que muchos de los anticuerpos dirigidos contra epítomos externos de P-gp



170, como MRK 16, HYB 241 y UIC2, son capaces de modificar la función expulsora de fármacos por parte de la bomba (Mickisch *et al*, 1992). Anticuerpos como 4E3, 15D3 y 17F9 no afectan al acúmulo intracelular de fármacos en las células con fenotipo MDR (Arceci *et al*, 1993, Shi *et al*, 1995). La ventaja de estos anticuerpos es que permiten la realización de estudios funcionales combinados con la valoración inmunofenotípica sin interferir en la dinámica de incorporación y expulsión de DNR (Arceci *et al*, 1993, Shi *et al*, 1995).

De todos modos, para el estudio de la expresión de P-gp 170 la mayoría de grupos de trabajo han utilizado el anticuerpo monoclonal MRK 16, que reconoce un epítipo externo de la glicoproteína de origen humano (Gheuens *et al*, 1991, Ferrand *et al*, 1996). También se han utilizado anticuerpos contra epítopos intracitoplasmáticos, como JSB1 y C219, con peores resultados dado que requieren una permeabilización de la membrana celular lo que conlleva, además de una dificultad mayor en la técnica, la muerte de las células (Grogan *et al*, 1990).

En nuestro trabajo, además del estudio funcional del fenómeno MDR nos pareció interesante comprobar la expresión de la bomba en la membrana de las células quimiorresistentes tanto al inicio del experimento como a lo largo del tiempo en que se realizaron los experimentos. Para ello hemos utilizado una técnica de inmunofluorescencia indirecta realizando la lectura por CMF y utilizando el anticuerpo monoclonal 4E3. La decisión de utilizar 4E3 se basa en que no requiere para el marcaje la permeabilización de la membrana de la célula y no interfiere con la función de la bomba (Arceci *et al*, 1993). Esta última característica, aunque no es importante para desarrollar el presente trabajo, sí es fundamental para futuros experimentos, puesto que permite realizar estudios combinados de expresión y función de P-gp 170.

En los experimentos hemos observado que las células sensibles muestran negatividad para 4E3, sin embargo en las células transfectadas se evidencia una alta positividad para 4E3, siendo el valor medio del histograma de fluorescencia del orden de 20-24 veces más intenso que en las células sensibles. Como era de esperar, este resultado muestra que existe una elevada expresión de P-gp 170 en la membrana de las células transfectadas en comparación con las sensibles. Hemos observado que la intensidad de expresión de P-gp 170 no ha variado en los sucesivos pases de cultivo y que se ha mantenido estable durante el tiempo en que se ha desarrollado el trabajo experimental.

Creemos que esta característica debe ser comprobada en cualquier modelo de laboratorio que utilice líneas celulares puesto que generalmente los estudios se llevan a cabo en un periodo de tiempo prolongado y se requiere la realización de múltiples subcultivos celulares. El cambio de fenotipo tanto en las células sensibles como en las resistentes con el tiempo podría constituir un sesgo en la realización de los experimentos, llevando a resultados y conclusiones erróneas.

Con la aplicación de estas técnicas de CMF en nuestro modelo experimental basado en las células sensibles y transfectadas, hemos observado que citométricamente, cada uno de los tipos celulares da lugar a la aparición de un "cluster" homogéneo y similar en las características de tamaño y complejidad. Este hallazgo está en concordancia con el hecho de que la observación morfológica de las células no permite distinguir claramente las células sensibles de las resistentes. Tampoco se evidencia un nivel de fluorescencia significativo en las medidas basales de fluorescencia previas a la adición de DNR y los valores de fluorescencia basal en las células 3T3-*mdr1* son similares a los de las células salvajes. Estos datos confirman que la autofluorescencia celular es mínima, lo que supone una ventaja para nuestro trabajo ya que la muy baja autofluorescencia celular no interfiere con nuestro estudio y va a permitir que el citómetro pueda detectar pequeños cambios en la fluorescencia celular por el acúmulo de substratos fluorescentes de P-gp 170. La base de nuestros experimentos es la valoración de la concentración intracelular de un fármaco fluorescente como es DNR, por lo que estamos midiendo diferentes grados de fluorescencia. Esta medición es más fácil y objetiva puesto que partimos de niveles de fluorescencia basales mínimos y similares en todas las células y diferentes situaciones en las que se desarrolla el experimento y no depende del tipo celular.

Una dificultad en la realización e interpretación de los estudios funcionales sobre MDR es la necesidad de disponer de células viables, que presenten no tan solo un aspecto microscópico adecuado sino sus funciones vitales perfectamente conservadas. Con la voluntad de asegurar la viabilidad celular durante cada experimento, nuestro grupo ha aplicado tests basados en el uso de fluorocromos que no atraviesan la membrana de las células vivas como es el yoduro de propidio. Este procedimiento parece que es más sensible que el del azul de tripán u otros colorantes supravitales.

La viabilidad de las células ha sido comprobada antes y durante el desarrollo de los experimentos. En la mayoría de experimentos realizados se ha constatado una alta viabilidad celular (mayor al 90 %, siendo este el dintel marcado por nosotros para considerar el experimento como válido), tanto en las células sensibles como en las resistentes con y sin modulador. Este procedimiento se ha realizado antes y durante el desarrollo de los experimentos, con el fin de comprobar un mantenimiento de las funciones vitales de las células durante todo el proceso.

No tan solo es imprescindible asegurar la viabilidad de las células en las que se desarrolla el modelo sino que también es fundamental proporcionarles unos cuidados y un mantenimiento adecuado con el fin de obtener unos resultados objetivos. En experimentos previos, hemos observado una significativa reducción en la capacidad de la bomba para expulsar DNR en situaciones de acidificación. Estas situaciones se han producido en casos de sobrecrecimiento celular y falta de medio nutritivo suficiente. Se realizaron los experimentos, en comparación con células en condiciones correctas, con el fin de valorar cambios en la función de P-gp 170. Algunos autores han demostrado que la acidificación del medio de cultivo está asociada con una reducción en la función de P-gp 170 pero no con la reducción de su expresión en la membrana celular (Hegewisch-Becker *et al*, 1996). Este fenómeno podría tener importancia cuando estos procedimientos son aplicados células neoplásicas de pacientes en la aplicación clínica de la valoración funcional del fenotipo MDR en células tumorales de pacientes: las células que se encuentran en la zona central de un tumor o en zonas mal irrigadas pueden sufrir una reducción en la vascularización sanguínea y por tanto una privación de nutrientes llevando a una acidificación intratumoral. El estudio funcional de P-gp 170 en estas células tumorales podría dar lugar a resultados discrepantes y a dificultades en la interpretación del fenómeno. Por ejemplo, células con alta expresión de P-gp 170 pero que se encuentren en condiciones de privación nutricional o hipoxia, podrían ser catalogadas como funcionalmente no involucradas en el fenómeno MDR.

A partir de los estudios de viabilidad celular realizados en los diferentes experimentos, hemos observado que no existe un incremento significativo en la mortalidad de las células transfectadas en presencia de modulador. Ello podría deberse a que el tiempo en que se lleva a cabo el experimento es proporcionalmente reducido respecto al tiempo necesario para que la acción citotóxica de DNR provoque la muerte celular. La

acción citotóxica de DNR se debe a que se intercala entre las bases de DNA impidiendo la síntesis adecuada de ácidos nucleicos. El tiempo esperado hasta que se produce la muerte celular depende de la dosis del fármaco en las zonas diana y de la actividad celular. El efecto citotóxico real de la DNR sobre las células podría comprobarse con la realización de ensayos clonogénicos. Estos experimentos se basan en la observación de la viabilidad celular durante el crecimiento de las células en cultivo, una vez realizado el estudio funcional, valorando la posible acción citotóxica de las drogas utilizadas. La limitación del estudio funcional del fenómeno MDR se deriva de la necesidad de mantener y asegurar una correcta viabilidad celular durante el experimento. Esta limitación no existe si se estudia el fenotipo MDR mediante anticuerpos monoclonales o PCR.

4.- ESTUDIOS DE INCORPORACION/EXPULSION

En experimentos de laboratorio se puede valorar la capacidad inhibidora de un fármaco sobre P-gp 170 tanto en experimentos de incorporación de DNR como de capacidad de retención por parte de la célula. Se trata de dos modos diferentes de enfocar el estudio del fenómeno MDR de modo funcional pero la información que se obtiene al realizar un experimento completo es más amplia y explica de una forma más detallada cuál es la repercusión de la acción del fármaco sobre la función expulsora de P-gp 170. Esta opinión coincide con la de otros autores que también sugieren que la realización de ambos tipos de experimentos, de incorporación y expulsión, da una visión más amplia de la acción de la bomba y de su posible modulación e incluso proporciona una mayor sensibilidad al estudio funcional de P-gp 170 (Ross *et al*, 1993).

Los estudios funcionales de P-gp 170 se pueden realizar estudiando únicamente la incorporación, la expulsión o ambos fenómenos de forma secuencial. En los estudios de incorporación se valora la capacidad de la bomba para reducir la concentración intracelular de la sustancia fluorescente durante un procedimiento de "llenado" celular. DNR penetra en el interior celular por un mecanismo de difusión pasiva, con tendencia al equilibrio con el medio extracelular. La acción de P-gp 170 provoca una reducción de la concentración intracelular de dicha sustancia, a través de una expulsión activa de la misma hacia el exterior celular. La incubación con fármacos moduladores modifica la cinética de incorporación de DNR a través de la inhibición de la acción de la bomba.

Los estudios de expulsión se basan en valorar la capacidad celular de retención de sustancia fluorescente frente a un medio libre de dicha sustancia. La mayor o menor rapidez con que se reduce la fluorescencia intracelular y los niveles de fluorescencia que se consiguen tras el equilibrio, en presencia o no de moduladores permiten valorar la función expulsora de P-gp 170.

La valoración funcional de P-gp 170 ha sido realizada de distinta forma por los diferentes autores que trabajan sobre el tema. Algunos investigadores han realizado ambos tipos de experimentos pero la mayoría de ellos han optado por un solo aspecto del problema o por ambos aspectos pero en procedimientos distintos.

Autores como Herweijer y Chin-Yee realizan únicamente experimentos de incorporación, tanto de RH 123 como de DNR (Herweijer *et al*, 1989, Chin-Yee *et al*, 1996). Otros grupos realizan ambos tipos de estudios pero en dos experimentos por separado (Ludescher *et al*, 1992, Berman and McBride, 1992, Feller *et al*, 1995). Paietta y Leith realizan únicamente experimentos de expulsión (Paietta *et al*, 1995, Leith *et al*, 1995). Pétriz y colaboradores realizan ensayos funcionales a través de la valoración de la incorporación y expulsión de RH 123 de forma secuencial en líneas celulares resistentes tras pases con fármacos.

Nuestro grupo realizó experimentos de incorporación y expulsión de forma continua pretendiendo por una parte valorar la capacidad de P-gp 170 para reducir la concentración intracelular de distintas drogas en experimentos de incorporación y por otra parte valorar su funcionalismo en experimentos de expulsión. Hemos aprovechado los experimentos de incorporación para realizar a continuación los experimentos de expulsión. De este modo se puede obtener una lectura secuencial de todo el fenómeno. Concretamente, tal y como aparece en Material y Métodos, la valoración de la capacidad de incorporación de DNR por parte de las células se realiza midiendo la fluorescencia intracelular máxima alcanzada a los 60 min una vez se ha llegado al equilibrio en la incorporación del fármaco en el interior y exterior celular. Retiramos el medio extracelular y resuspendemos a las células en medio libre de sustancia fluorescente, pero conteniendo la misma concentración de fármaco modulador que en la incubación inicial. A partir de ese momento se realizan medidas secuenciales en el tiempo para valorar la disminución de la fluorescencia intracelular y por tanto de la concentración intracelular de DNR, que nos da una idea de la capacidad de retención del fármaco por parte de la célula frente a un medio extracelular libre de fármaco fluorescente y de su modificación en presencia de un modulador. Creemos que la

realización de ambos experimentos de forma continua es un método más rápido y que da la misma información que los dos métodos por separado. El tiempo que se invierte en realizar la incubación de las células con el modulador y la sustancia fluorescente previa al lavado, en los experimentos de expulsión, puede aprovecharse para realizar medidas de fluorescencia secuenciales y obtener datos de la cinética de incorporación. Para las comparaciones entre los diferentes tipos celulares y situaciones (con y sin modulador) se pueden utilizar estos valores, ya que se parte de unos niveles basales de fluorescencia similares en todas las células. Sin embargo, para la valoración de los experimentos de expulsión, y dado que en cada tipo celular se parte de niveles distintos de fluorescencia, se han utilizado los “porcentajes de expulsión” de DNR. Estos valores se refieren a la capacidad de expulsión de cada célula en relación con la cantidad de DNR que se encuentra en su interior tras el proceso de incorporación, y permiten realizar comparaciones más fidedignas.

5.- ESTUDIO FUNCIONAL DE P-gp 170

Como predecíamos en la aproximación teórica del modelo, tras la adición de DNR a las células 3T3 y 3T3-*mdr1* se produce un incremento progresivo de fluorescencia. Este aumento llega a un equilibrio dinámico alrededor de los 50-60 minutos. En las células 3T3-*mdr1* se consiguen niveles claramente inferiores (12 veces menores) que en las células salvajes. Por otra parte, en estos experimentos las células 3T3-*mdr1* mostraron una expulsión rápida y casi completa de la DNR del interior al exterior celular. Los porcentajes de expulsión en las células transfectadas son del orden del 80 %, de modo que tras 60 minutos de expulsión se alcanzaron niveles de fluorescencia prácticamente similares a los basales. Sin embargo, las células sensibles, mostraron una salida lenta de DNR al exterior celular. Llegan a un equilibrio a los 60 minutos con niveles superiores de fluorescencia que las células transfectadas. Los porcentajes de expulsión son del orden de 30-40 %. En estas células se acepta que la salida de DNR al exterior de la célula se debe a una difusión pasiva de la misma frente a un medio libre de droga. Las diferencias entre ambos tipos celulares son explicadas por la existencia de la bomba de expulsión activa en la membrana de las células quimiorresistentes frente a un medio extracelular con DNR (experimentos de incorporación) o libre de fármaco (experimentos de expulsión).

El tiempo de duración de los experimentos de incorporación y expulsión se estableció en 60 minutos porque en experimentos de incorporación previos realizados durante un tiempo más prolongado (hasta 150 minutos) no se evidenciaron aumentos del nivel de fluorescencia a partir de los 60 minutos, pero algunos grupos obtienen niveles máximos de fluorescencia en tiempos más cortos o más prolongados, utilizando las mismas concentraciones de fármacos fluorescentes aunque en estudios sobre distintas líneas celulares. Probablemente estas diferencias se deben a la distinta permeabilidad de la membrana celular y la diferente intensidad de expresión y función de la bomba expulsora en cada tipo celular. De esta observación se desprende que para cada modelo es necesario realizar ajustes en las técnicas utilizadas para el estudio funcional para optimizar las condiciones experimentales.

En los procedimientos para el estudio de incorporación y/o expulsión de sustancias en células se determina la cantidad intracelular de sustancia que permanece en equilibrio con el medio extracelular resultado del balance de la entrada y salida a través de la membrana. Si las células poseen una bomba de membrana que de forma activa sea capaz de expulsar drogas fuera de las células, la concentración intracelular de droga será menor en el momento del equilibrio con el medio exterior, dado que a medida que se produce la entrada de fármaco en la célula, éste va siendo expulsado. En este fenómeno se basa el estudio funcional de P-gp 170. Además si se dispone de dos líneas celulares (sensibles y resistentes) en las que la única diferencia entre ambas sea la existencia de este mecanismo de expulsión activa en las células transfectadas (Shen *et al*, 1986), se puede concluir que la observación de los distintos niveles de fluorescencia alcanzados por los dos tipos celulares se debe a la expresión de una bomba funcionalmente activa en las células 3T3-*mdr1*.

6.- IMPORTANCIA DEL CONTAJE CELULAR

En experimentos previos, hemos observado que el nivel de fluorescencia intracelular en el equilibrio depende evidentemente de la concentración de fármaco fluorescente utilizada pero también de la concentración celular, es decir de la mayor o menor distribución de DNR en las células.

A mayor cantidad de células en el tubo, si existe la misma concentración de DNR, se produce un reparto de DNR entre mayor número de células y por tanto se reduce la cantidad máxima de sustancia fluorescente que puede entrar en cada célula. Si la concentración celular es pequeña, la DNR se distribuye menos, resultando en una mayor entrada de droga fluorescente al interior celular y un aumento en la fluorescencia intracelular. Este fenómeno podría llevar a conclusiones erróneas. Por ejemplo, un acumulo reducido de DNR en una muestra celular con respecto a otra muestra con una concentración celular menor puede interpretarse como la existencia en la primera muestra de una mayor actividad de P-gp 170. Por ello, uno de los puntos que hemos considerado críticos de nuestro modelo experimental es la importancia de asegurar que en todo momento que trabajamos en las mismas condiciones experimentales.

En nuestro modelo, hemos utilizado un mismo número de células por tubo en todos los experimentos (0.5×10^6 células por tubo). Creemos que es muy importante asegurar esta constante pues hemos observado que variaciones del orden del 20 % en la cantidad de células por tubo producen variaciones finales de fluorescencia a los 60 minutos del orden de un 10 %.

Para realizar los contajes celulares y dado que el citómetro de flujo no proporciona contajes absolutos utilizamos inicialmente métodos como el contaje manual en cámara de Neubauer y el contaje a través de un hemocitómetro, obteniendo resultados poco fidedignos. Las limitaciones de estas técnicas nos llevaron a utilizar un método de contaje basado en tubos especiales que contienen pequeñas bolas fluorescentes, a través de técnicas de CMF. Este método proporciona contajes celulares exactos, lo que nos permite asegurar la reproducibilidad y validez de los experimentos.

Otros autores no ofrecen detalles del método utilizado en sus trabajos para el contaje celular, aunque la mayoría de ellos trabajan con concentraciones celulares concretas.

En la aplicación clínica de estos procedimientos basados en el estudio del acúmulo-expulsión de DNR la limitación radica en que el número de células estudiadas y la proporción de células presuntamente resistentes varía en cada experimento. La información que se obtendrá estará condicionada por estos dos factores, de modo que es difícil poder comparar los resultados funcionales entre diferentes muestras y pacientes. Una solución podría estar en emplear para la comparación de resultados, no los canales de

fluorescencia, sino constantes de actividad de la bomba obtenidas por ecuaciones de ajuste matemático de las curvas de las cinéticas medidas por CMF.

7- IMPORTANCIA CLINICA DEL ESTUDIO DE P-GP 170 Y DE SU MODULACION

La trascendencia clínica del fenómeno MDR radica en que, pese a considerarse una importante causa de fracaso en el tratamiento de las neoplasias humanas, existe la posibilidad de modificar la acción de P-gp 170 consiguiendo resensibilizar a las células tumorales (De Vita, 1989).

La quimiorresistencia que se atribuye al fenotipo MDR se debe a la acción de una bomba expulsora de determinados fármacos citotóxicos que está codificada por el gen *mdr1* (Juliano and Ling, 1976). P-gp 170 es una fosfoglicoproteína transmembranaria ATP dependiente que causa una reducción de la concentración intracelular de fármacos quimioterápicos y de su acción citotóxica (Higgins *et al*, 1992). La detección y caracterización de células resistentes en muestras tumorales podría ser un parámetro muy importante para la valoración terapéutica y pronóstica de los pacientes con neoplasias. Además, la investigación sobre sustancias moduladoras capaces de revertir el fenómeno MDR con una toxicidad aceptable para el paciente permitiría desarrollar pautas o protocolos de fármacos o combinaciones utilizables en la práctica clínica (George *et al*, 1995). De todos modos, MDR no es el único mecanismo de resistencia conocido, además del fenómeno MDR atribuido a P-gp 170, se han descrito otros mecanismos de resistencia farmacológica similares pero que no están relacionados con esta glicoproteína como son MRP y LRP (Mattern and Volm, 1993).

La bomba P-gp 170 se ha implicado como mecanismo de resistencia tumoral en un gran número de neoplasias humanas, ya sea en el momento del diagnóstico o a lo largo del tratamiento, asociándose al fracaso del mismo y en muchas ocasiones al agotamiento de las alternativas terapéuticas (Bellamy, 1990a). Esto se debe a que en el fenómeno MDR están implicados muchos de los fármacos que se utilizan en el tratamiento del cáncer, la mayoría de ellos derivados de productos naturales. La detección de P-gp 170 en las células neoplásicas de pacientes permitiría adecuar el tratamiento quimioterápico de forma individualizada. Sería posible elegir fármacos que no estuvieran implicados en este fenómeno, de un modo similar a selección del tratamiento antibiótico de los procesos

infecciosos basado en el antibiograma, que valora la sensibilidad del germen a diferentes antibióticos. En el caso de enfermedades neoplásicas que presentaran el fenotipo MDR en el momento del diagnóstico, sería muy conveniente administrar de entrada fármacos no relacionados con el fenómeno, con lo que se evitaría la falta de respuesta inicial al tratamiento o resistencia primaria dependiente de P-gp 170. En aquellos pacientes ya tratados y que presentan resistencia adquirida o bien en caso de recidiva, la administración de fármacos no relacionados con P-gp 170 podría constituir una alternativa de tratamiento para ellos.

Desde los experimentos de Tsuruo y colaboradores en 1981, se conoce que la acción de P-gp 170 puede ser inhibida farmacológicamente. La posible aplicación clínica de fármacos con acción moduladora de la bomba abriría una vía terapéutica muy importante en pacientes con neoplasias resistentes. Sin embargo, muchos son los experimentos de laboratorio y estudios clínicos que sugieren que, si bien la inhibición del fenómeno MDR es posible, la aplicación clínica de los fármacos moduladores conocidos actualmente está limitada por una toxicidad muy elevada a las dosis necesarias para inhibir P-gp 170 de forma satisfactoria y/o completa (Lum and Gosland, 1995). En la actualidad se están estudiando nuevos fármacos con supuesta capacidad moduladora pero con una razón toxicidad/beneficio aceptable de modo que supongan una alternativa válida para el tratamiento de las neoplasias que expresan el fenotipo MDR (van der Heyden *et al*, 1995).

La administración de fármacos presuntamente moduladores a pacientes con neoplasias quimiorresistentes, cuando ya se han agotado todas las alternativas terapéuticas disponibles, es una buena oportunidad para la valoración en condiciones de práctica clínica e "in vivo" de la acción de estas drogas moduladoras. El posible beneficio individual puede justificar la arriesgada decisión de administrar una droga de efectos no suficientemente probados pero sitúa al clínico en una encrucijada ética por las posibles repercusiones debidas a los efectos perjudiciales sobre el paciente de esta actitud. De todos modos, los estudios clínicos son necesarios para confirmar la acción moduladora sobre pacientes con neoplasias con fenotipo MDR de las drogas moduladoras, y no tan solo sobre pacientes terminales en los que se han agotado todas las opciones de tratamiento, sino también en aquellos en los que todavía existen fundadas esperanzas de conseguir un cambio sustancial en el estado y/o evolución del paciente. De hecho, ya hemos citado que en los últimos años se han llevado a cabo estudios clínicos para evaluar

el beneficio del empleo de moduladores, como VRP, ciclosporina A y otros, en series de pacientes con neoplasias

Puesto que para que los efectos de la acción moduladora de un fármaco sean atribuibles a una inhibición específica de la función de P-gp 170 es fundamental demostrar que los cambios en la dinámica de incorporación de sustratos de P-gp 170 en células quimiorresistentes se deben únicamente a modificaciones en la función de la bomba. Por ello, es indispensable descartar que en la valoración de la función de P-gp 170 no estén actuando otros mecanismos de resistencia distintos como MRP, LRP u otros todavía desconocidos (Feller *et al*, 1995, Ferrand *et al*, 1996, Webb *et al*, 1996)

Los diferentes modelos utilizados para el estudio del fenómeno MDR y la falta de un método de trabajo estandarizado ha llevado a la aparición de resultados muy heterogéneos y discordantes entre los distintos grupos que trabajan en este tema (Boiron *et al*, 1994, Marie, 1995). La mayoría de trabajos de laboratorio publicados se basan en la utilización de líneas celulares de neoplasias humanas o animales a las que se les ha inducido el fenómeno MDR tras pases sucesivos con diferentes fármacos antineoplásicos o en estudios sobre células neoplásicas obtenidas de pacientes con tumores quimiorresistentes. El problema, y probablemente una de las causas de las discrepancias entre los estudios, es que estas células han podido desarrollar mecanismos de resistencia diferentes o concomitantes a MDR (Campos *et al*, 1992, Paletta *et al*, 1995, Broxterman *et al*, 1996). Autores como Chin Yee encuentran discordancias entre los resultados del estudio funcional por CMF y el estudio inmunofenotípico de P-gp 170 con el anticuerpo 4E3 en un grupo de pacientes con LLC (Chin Yee *et al*, 1996). Los autores atribuyeron esta discrepancia a que el acúmulo de DNR en los linfocitos neoplásicos podía estar influido por otros mecanismos de expulsión de drogas no relacionados con P-gp 170.

Antes de la generalización de la realización de ensayos "in vivo" para comprobar la supuesta capacidad moduladora de nuevos fármacos, son indispensables estudios en modelos de laboratorio que de modo repetitivo, controlado y experimental demuestren objetivamente si un determinado fármaco con presunta capacidad para inhibir específicamente P-gp 170 presenta una acción inhibitoria suficiente como para ser considerado de utilidad clínica (Ford *et al*, 1995). Siguiendo esta opinión, la voluntad de

nuestro grupo ha sido desarrollar un método de laboratorio que cumpliera las características enunciadas y que pudiera ser aplicado posteriormente para el estudio "ex vivo" del fenómeno MDR sobre muestras clínicas.

8.- EXPERIMENTOS DE MODULACION

Hemos comprobado que en nuestro modelo experimental, empleando anticuerpos monoclonales contra P-gp 170 y/o estudios funcionales con DNR, puede detectarse la presencia de P-gp 170 en la membrana celular y valorar su función como bomba expulsora de fármacos. Pero nuestro interés sobre el fenómeno de resistencia a drogas no se limitaba a comprobar si con la CMF éramos capaces de realizar el estudio funcional del fenómeno MDR. Creemos que la importancia de los estudios sobre este fenómeno estriba en el hecho de que P-gp 170 puede ser modulada y que esta circunstancia tiene una repercusión clara en el tratamiento de los pacientes neoplásicos. Por ello nuestro siguiente objetivo era comprobar si a través del modelo experimental era posible evidenciar la inhibición de la acción de la bomba por sustancias moduladoras.

8.1.- VERAPAMILO

En esta línea nació el proyecto que ha dado lugar a esta tesis. Nuestro grupo decidió plantear los experimentos de modulación utilizando una sustancia cuya acción sobre P-gp 170 estuviera comprobada en otros trabajos. De esta forma se podría disponer de un fármaco que nos permitiera validar el modelo experimental. Además podría actuar como control positivo de modulación para el estudio de la capacidad moduladora de otros fármacos en condiciones experimentales. Para ello se escogió VRP, un fármaco con acción bloqueante de los canales del calcio.

VRP es uno de los primeros fármacos que se aplicaron en la modulación de P-gp 170 (Tsuruo *et al*, 1981) y su acción inhibidora de la bomba ya ha sido demostrada en numerosos estudios.

Para la aplicación de este fármaco se realizaron experimentos para valorar las concentraciones mínimas con capacidad para modular la bomba. Para ello se realizaron estudios de cinética de incorporación de DNR con concentraciones escaladas de VRP. Las concentraciones iniciales utilizadas se escogieron a partir de datos de la literatura (Tsuruo

et al, 1982; Lautier *et al*, 1994). En estos experimentos pudimos observar que la concentración mínima de VRP que inhibió de forma completa la acción de P-gp 170, es decir, que produjo una transformación de la cinética de incorporación de DNR en las células resistentes en una cinética similar a la de las células sensibles, fue 10 μM . Esta acción inhibitoria de P-gp 170 no se consiguió con concentraciones de 1 μM y 5 μM . Concentraciones superiores del fármaco (20 μM) no consiguieron mejores resultados, valorándose como una saturación en el fenómeno de modulación. El fenómeno de saturación es explicable puesto que se conoce que VRP ejerce su acción moduladora a través de un mecanismo de bloqueo de los sitios de unión de P-gp 170 a los fármacos fluorescentes. Este hecho sugiere que una vez se han bloqueado todos los sitios activos de la glicoproteína, utilizando una concentración determinada del fármaco modulador, el aumento en el número de moléculas de esta sustancia no producirá un mayor efecto bloqueante de la bomba.

Nuestros resultados están de acuerdo con la mayoría de trabajos realizados en laboratorio, en los que se requieren concentraciones de 6 μM a 10 μM para la inhibición completa de P-gp 170 y así mismo evidencian el fenómeno de saturación de la modulación (Lautier *et al*, 1994). Autores como Kessel, Bellamy, Akiyama y otros, realizaron los primeros estudios de la acción de VRP sobre células con fenotipo MDR inducido tras pases con quimioterápicos (línea de leucemia murina, línea de mieloma humana y otras) obteniendo resultados similares y llegando a la conclusión de que la acción de moduladora de VRP se debe a un bloqueo de los sitios de unión de P-gp 170 a las drogas substratos de la bomba. De esta forma estas sustancias no pueden ser expulsadas de forma activa al exterior celular y permanecen durante más tiempo dentro de la célula con lo que aumenta su acción lesiva celular.(Kessel *et al*, 1985; Bellamy *et al*, 1988; Akiyama *et al*, 1988). Posteriormente muchos han sido los trabajos que han confirmado este mecanismo, bien valorando la acción de VRP de forma aislada o en comparación con otros fármacos moduladores (Lautier *et al*, 1994, Spoelstra *et al*, 1994).

Una vez definida la concentración mínima de VRP con capacidad para modular P-gp 170, así como el tiempo de incubación necesario, se llevaron a cabo varios experimentos de incorporación y expulsión de DNR para definir la acción moduladora de VRP en condiciones de experimentación. Estamos de acuerdo con la opinión de algunos investigadores que en experimentos de laboratorio, dónde es posible la valoración de la capacidad inhibitoria de un fármaco sobre la bomba aplicando tanto experimentos de

incorporación como de capacidad de retención de sustancias por parte de la célula, es adecuado estudiar el fenómeno MDR y su modulación con estas dos formas diferentes de enfocar el estudio funcional. La información que se obtiene al realizar un experimento completo explica de una forma mas detallada cual es la repercusión de la acción del fármaco sobre la función expulsora de P-gp 170.

La posibilidad de que VRP pudiera producir una acción inespecífica sobre la membrana de las células de nuestro modelo se descartó al observar que la acción de VRP sobre las células sensibles no inducía variaciones en la cinética de incorporación ni de expulsión de DNR.

A partir de los experimentos de incorporación y expulsión realizados con el fin de evidenciar la acción moduladora completa de VRP se obtuvieron una serie de resultados. La presencia de VRP induce un mayor acumulo de DNR en las células 3T3-*mdr1*, con relación a las mismas células en ausencia del modulador. Es decir, la adición de esta sustancia bloquea la acción de la bomba expulsora de la membrana, reduciendo la expulsión de DNR y dando lugar a una cinética de incorporación significativamente diferente a las células resistentes en ausencia de VRP. Estas células incorporan aproximadamente 11 veces más DNR cuando se incuban con el fármaco. Además la presencia del modulador tras el lavado de las células transfectadas produce una disminución en la capacidad expulsora de DNR hacia el medio extracelular. Se reduce así su porcentaje de expulsión en más de un 50% con relación a las mismas células sin VRP.

La capacidad moduladora de VRP se confirma al evidenciarse que los niveles de fluorescencia intracelular en las células 3T3-*mdr1* en presencia del modulador son similares a los alcanzados por las células 3T3 con o sin modulador. La diferencia estimada entre los niveles de DNR acumulada en las células 3T3-*mdr1* incubadas con VRP y las células sensibles 3T3 es de -531.3 a 1286.7 UA. Además, la capacidad de expulsión de DNR en presencia del modulador en las células transfectadas después del lavado (porcentaje de expulsión: 33.8%) se asemeja a la capacidad expulsora de las células sensibles (porcentaje de expulsión: 32.0%). Este es un dato fundamental en la valoración de la capacidad moduladora de VRP, puesto que como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, fue uno de los parámetros establecido "a priori" por nuestro grupo para considerar una modulación completa del fenómeno MDR.

Estos resultados, que avalan la capacidad moduladora de VRP han sido ampliamente reportados en la literatura, por lo que no suponen una conclusión relevante de

nuestro trabajo. Sin embargo, la realización de experimentos con VRP ha sido fundamental en el desarrollo del modelo experimental por varias razones: por una parte, ya que la validación del modelo, es decir la confirmación de que a través de este método es posible evaluar la capacidad de P-gp 170 para ser inhibida, requiere el uso de un probado modulador de la bomba. Además, y puesto que uno de los objetivos del trabajo es valorar la capacidad moduladora de fármacos con supuesta actividad inhibidora de P-gp 170, es necesario disponer de un control positivo de modulación frente al que comparar la acción de los fármacos a estudio.

Otro de los fármacos con demostrada acción moduladora sobre P-gp 170 que podría haber sido utilizado es la ciclosporina A. Esta sustancia ha sido utilizada en diversos trabajos como control positivo de modulación (Twentyman *et al*, 1987). En nuestro trabajo hemos decidido utilizar VRP por varias razones. La manipulación de ciclosporina A requiere una serie de precauciones dados sus importantes efectos tóxicos. Este problema no es tan importante en el caso de VRP. Además, para la preparación de las soluciones de trabajo de Ciclosporina A es necesario el uso de productos artificiales (como Tween 80). Sin embargo la preparación de VRP es sencilla ya que se disuelve fácilmente en agua destilada y ello que permite una mayor similitud con las condiciones fisiológicas en los pacientes y de las células de los modelos de laboratorio.

A pesar de la evidencia de que la acción de P-gp 170 puede ser inhibida "in vitro", la aplicación posterior de VRP en pacientes ha sido desafortunada, debido a que las dosis necesarias para ejercer su actividad moduladora conllevan una toxicidad evidente (Dalton *et al*, 1994). La toxicidad cardiovascular es dosis-limitante a concentraciones séricas de 1 a 2 μM mientras en la mayoría de modelos "in vitro" se requieren concentraciones de 6-10 μM para la inhibición completa de P-gp 170.

Dalton y sus colaboradores (1989a) realizaron un estudio clínico piloto en siete pacientes con MM refractario al tratamiento convencional (régimen VAD). La administración del verapamilo fue por vía endovenosa de forma continua mientras se administraba el tratamiento quimioterápico, produciéndose niveles séricos variables entre 200 y 1000 ng/ml. Dos de los cinco pacientes cuyas células mielomatosas expresaban P-gp 170 obtuvieron una buena respuesta, aunque la toxicidad sobre todo a nivel cardiovascular (hipotensión y arritmias cardíacas) fue dosis-limitante. Ninguno de los pacientes sin fenotipo MDR respondió al tratamiento con VRP. Pese a que la duración de las respuestas al tratamiento fue corta, este estudio mostró que la detección del fenotipo MDR podía

identificar a pacientes con posibilidad de beneficiarse del uso de drogas moduladoras. El estudio se continuó en 1991 con 22 pacientes de MM (Salmon et al, 1991). Del grupo de 10 pacientes con fenotipo MDR, 4 obtuvieron respuesta tras la administración de altas dosis de verapamilo en infusión continua junto al tratamiento con VAD. No se objetivó respuesta en los pacientes sin fenotipo MDR.

Miller y colaboradores, en 1991, estudiaron el efecto de altas dosis de verapamilo en infusión continua (niveles séricos entre 307 y 1810 ng/dl), asociado al tratamiento quimioterápico convencional en 18 pacientes con linfoma refractario al tratamiento, obteniendo un 42 % de respuestas favorables. Los efectos secundarios de predominio cardiovascular fueron importantes. Estos estudios piloto sirvieron de base para un ensayo aleatorizado fase III, llevado a cabo en 1994 por el Southwestern Oncology Group (Dalton et al, 1994), que comparaba los resultados del tratamiento VAD frente a VAD junto con verapamilo en MM refractario. El estudio se llevó a cabo en 120 pacientes de MM resistente o en recidiva. El tratamiento con verapamilo fue administrado por vía oral, alcanzándose niveles séricos de entre 150 y 400 ng/dl. Este estudio fue incapaz de demostrar un efecto beneficioso de la adición de verapamilo al tratamiento VAD barajándose diferentes motivos: la existencia de otros mecanismos de resistencia distintos de P-gp 170, la utilización de dosis insuficientes del modulador (lo que explicaría la falta de efectos secundarios encontrados en el trabajo) y su administración vía oral de forma discontinua (los estudios "in vitro" demuestran que un modulador debe permanecer de forma continua junto a las drogas quimioterápicas para poder ejercer su acción).

Los problemas derivados de la mala tolerancia de los fármacos con acción moduladora de P-gp 170 ha sido una limitación importante para la aplicación de estas sustancias moduladoras en la práctica clínica. A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos en los trabajos "in vitro" utilizando diferentes drogas con actividad inhibidora sobre la acción de P-gp 170, su aplicación en clínica tiene una serie de limitaciones: las dosis necesarias para revertir el fenómeno MDR en el laboratorio no pueden alcanzarse en clínica debido a los importantes efectos secundarios que comportaría su uso. Por otro lado es importante tener en cuenta que dado que P-gp 170 también se expresa en los tejidos sanos, fundamentalmente en tejidos con función excretora (hígado, riñón) y en las barreras hemáticas naturales (barrera hemato-encefálica, feto-placentaria y testicular), su inhibición puede producir una alteración en la farmacocinética y biodisponibilidad de la droga citotóxica utilizada. Así se dificultaría su eliminación, aumentarían sus niveles plasmáticos y

se llegarían a conseguir niveles altos de droga en tejidos sanos y en especial en aquellos habitualmente protegidos (SNC, placenta y feto, testículo). Por todo ello se podrían producir efectos secundarios más importantes y no habituales en este tipo de fármacos. Del mismo modo el acúmulo de fármaco citotóxico en el tejido hematopoyético produciría un aumento en la toxicidad hematopoyética (Lum and Gosland, 1995). Por otra parte, se ha demostrado que la actividad de las sustancias moduladoras se reduce claramente en presencia de proteínas séricas (en concentraciones fisiológicas), por lo que sus efectos en los pacientes pueden variar de forma importante (Lehnert, 1996b).

Entre las sustancias moduladoras descritas clásicamente se encuentran: bloqueantes de los canales de calcio (verapamilo, nifedipina, quinina, quinidina), inhibidores de la calmodulina (fenotiazinas), análogos del tripanarol (tamoxifeno, toremifeno), esteroides, progesterona, ciclosporina A y cefalosporinas (ceftriaxona, cefoperazona). A pesar de ser químicamente diferentes, estas sustancias comparten algunas características fundamentales para su acción moduladora sobre P-gp 170, como son una elevada lipofilia y la existencia en su molécula de dos anillos aromáticos planos.

8.2.- OTROS MODULADORES

La dificultad en la aplicación clínica de las drogas moduladoras denominadas "clásicas" ha llevado al estudio de otras sustancias con capacidad moduladora pero que pudieran ser aplicadas en la práctica clínica, por diferentes grupos de trabajo. Estas sustancias, que se han desarrollado con la única finalidad de modular la acción de P-gp 170 se denominan moduladores de "segunda" y "tercera generación". Entre los moduladores de "segunda" generación se encuentra un derivado de la ciclosporina D llamado PSC 833. Se ha sugerido que este fármaco posee una actividad moduladora de P-gp 170 más intensa que ciclosporina A (Jiang *et al*, 1995) pero no produce los efectos secundarios principales que limitan su aplicación clínica como son la inmunosupresión y la nefrotoxicidad.

Otros fármacos con posible actividad moduladora de MDR de reciente aparición y que están siendo estudiados actualmente son, entre otros:

- Análogos del verapamilo como son: R-verapamilo, nor-verapamilo, tiapamilo, Ro11-2933, dextniguldipina, y otros. (Toffoli *et al*, 1995)
- SDZ 280-446, ciclopéptido semisintético análogo no inmunosupresor de la ciclosporina D (Pourtier- Manzanedo *et al*, 1992).

- RU 486, compuesto antiprogéstágeno (Gruol *et al*, 1994).
- LY335979, derivado ciclopropildibenzosuberano (Dantzig *et al*, 1996)
- S9788, derivado triazineaminopiridino
- BIBW 22, análogo del dipiridamol
- Tolitoxina, producto natural derivado de un alga azul-verde

Otra forma de modulación de MDR consiste en la utilización conjunta de agentes conocidos como inhibidores de P-gp 170, que actúen de forma sinérgica, a menores dosis, con la posibilidad de obtener mejores resultados con menores efectos secundarios. Para ello, los fármacos utilizados deben cumplir dos condiciones básicas: no deben presentar un incremento en su toxicidad y deben producir una acción quimiosensibilizante aditiva o sinérgica en las células tumorales resistentes.

8.3.- PSC 833

A través de nuestro modelo experimental hemos sido capaces de comprobar que PSC 833 es un fármaco que puede modular de forma completa la acción de P-gp 170 en experimentos de incorporación. Sin embargo los resultados de los experimentos de expulsión con concentraciones de PSC 833 de 0.5 μ M han sido heterogéneos y del estudio estadístico se desprende que el efecto modulador de P-gp 170 en estos experimentos no es completo.

PSC 833 ([3'-keto-Bmt1]-Val2]-Cyclosporine) es un análogo no inmunosupresor de la ciclosporina D, desarrollado por Sandoz que se caracteriza porque se ha desarrollado específicamente con el fin de antagonizar la expulsión de drogas mediada por P-gp 170.

Algunos autores han publicado que PSC 833 ejerce a bajas concentraciones una intensa actividad inhibidora de P-gp 170 sin presentar efectos nefrotóxicos ni inmunosupresores (Twentyman *et al*, 1991, Gaveriaux *et al*, 1991; Boesch *et al*, 1991b; Jachez *et al*, 1993). Jiang y colaboradores han sugerido que PSC 833 es capaz de bloquear de forma específica la acción de P-gp 170 y de un modo más eficaz que ciclosporina A (Jiang *et al*, 1995). Otros autores, también en estudios funcionales, encuentran que PSC 833 tiene un efecto modulador más prolongado que ciclosporina A, atribuyendo esta mayor capacidad moduladora a que PSC 833 no es activamente transportado por P-gp 170 (Archinal-Mattheis *et al*, 1995; Naito *et al*, 1996).

Para la evaluación de la capacidad moduladora de PSC 833, se realizaron experimentos iniciales dirigidos a valorar las concentraciones adecuadas del fármaco, que consiguieran modular la bomba. Para ello se realizaron estudios de cinética de incorporación y expulsión de DNR con diferentes concentraciones de PSC 833. Las concentraciones iniciales utilizadas se escogieron a partir de datos de la literatura (Michieli *et al*, 1994, Jiang *et al*, 1995). En los experimentos de incorporación pudimos observar que PSC 833 era capaz de realizar una acción moduladora completa sobre P-gp 170, similar a la producida por VRP a una concentración de 10 μM , incluso a dosis tan bajas como 0.2 μM . Se observó que tras la incubación de las células resistentes con PSC 833 a concentraciones de 0.2 y 0.5 μM y la adición posterior de DNR, se conseguían niveles de fluorescencia intracelular similares a los de las células sensibles y a los producidos tras la incubación de las células resistentes con VRP. Estos resultados están de acuerdo con los de otros autores que han estudiado el efecto de PSC 833 en experimentos de laboratorio. Jiang y su grupo en un estudio realizado en líneas celulares de leucemia eritroide humana, reportan que PSC 833 (a dosis de 1-3 μM) es 10-30 veces más potente como modulador de P-gp 170 que ciclosporina A y que actúa bloqueando de forma específica la acción expulsora de fármacos de la bomba (Jiang *et al*, 1995). Estos autores no realizan experimentos con dosis menores de PSC 833, por lo que no es posible saber si este fármaco a concentraciones inferiores habría sido capaz de ejercer su acción sobre las líneas celulares utilizadas en su experimento. Michieli y su grupo demuestran una acción moduladora completa sobre la acción de P-gp 170 por PSC 833 a dosis de 0.4 μM , incluso en líneas celulares con altos niveles de resistencia en las que se requieren concentraciones muy elevadas de VRP o ciclosporina A para conseguir modulación (Michieli *et al*, 1994).

En nuestro modelo, dosis de PSC 833 de 0.1 μM únicamente produjeron una inhibición parcial del fenómeno. Es decir, aunque aumentaron de forma clara la entrada de DNR en las células resistentes, este cambio no fue suficiente para demostrar que la acción de la bomba estaba bloqueada de forma total, por lo que no se consideró como modulación completa de la acción de P-gp 170. Sin embargo existen estudios en los que dosis tan bajas como 0.1 μM sí producen una modulación completa del fenómeno. Ludescher y su grupo evidencian una acción moduladora de P-gp 170 por parte de PSC 833 en experimentos de expulsión a dosis de 0.1 μM (Ludescher *et al*, 1995).

Así mismo pudimos observar que concentraciones superiores de PSC 833 no produjeron aumentos significativos en la capacidad moduladora del mismo sobre la incorporación de DNR. Con la incubación de las células en presencia de concentraciones de PCS 833 hasta 100 veces más elevadas que la dosis mínima moduladora no se consiguieron niveles de fluorescencia intracelulares mayores en el momento del equilibrio, atribuyéndose este fenómeno a una saturación de la modulación de la bomba. El fenómeno de saturación se produce también en los experimentos de VRP que hemos realizado. Estos resultados se pueden explicar dado que se conoce que tanto PSC 833 como VRP ejercen su acción moduladora a través de un mecanismo de bloqueo de los sitios de unión de P-gp 170 a los fármacos fluorescentes. Este hecho sugiere que una vez se han bloqueado todos los sitios activos de la glicoproteína, utilizando una concentración determinada del fármaco modulador, el aumento en el número de moléculas de esta sustancia no producirá un mayor efecto bloqueante de la bomba. Resultados similares se obtuvieron en los experimentos de expulsión, aunque en esta parte del estudio se observó que PSC 833 a concentración 0.2 μM no era capaz de producir una mayor retención de DNR en el interior celular. La expulsión de DNR en las células resistentes sí se modificó en presencia de dosis más elevadas. De todo ello se desprende que la dosis mínima de PSC 833 con capacidad moduladora completa, en la incorporación y en la expulsión de DNR en las células resistentes de nuestro modelo es 0.5 μM . Esta es la concentración que hemos utilizado para la comprobación de la capacidad moduladora de PSC 833 en estudios repetidos sobre nuestro modelo. Otros autores que defienden la importante actividad de éste fármaco a dosis bajas son Archinal-Mattheis y Naito. Ambos autores basan el efecto modulador prolongado de PSC 833 en que esta droga no es transportada activamente por P-gp 170, a diferencia de Ciclosporina A (Archinal-Mattheis *et al*, 1995, Naito *et al*, 1996). Tiberghien y colaboradores realizan un estudio comparativo sobre diferentes moduladores de P-gp 170, siendo PSC 833 uno de los más potentes inhibidores del fenómeno MDR (Tiberghien and Loo, 1996).

El tiempo de incubación con PSC 833 se consideró que debía ser igual al utilizado en los experimentos con VRP para homogeneizar las condiciones experimentales y poder comparar los resultados.

Se realizaron sucesivos experimentos, de incorporación y expulsión de DNR, con el fin de definir la acción moduladora de PSC 833 en condiciones de experimentación, en

comparación con la acción de VRP. En experimentos de laboratorio, la valoración de la capacidad inhibidora de un fármaco sobre la bomba debe realizarse tanto en experimentos de incorporación de DNR como de capacidad de retención por parte de la célula. Pensamos, que aunque sean dos formas diferentes de enfocar el estudio del fenómeno MDR de modo funcional, la información que se obtiene deriva de una aproximación explicativa de la repercusión de la acción del fármaco sobre la función expulsora de P-gp 170. Este hecho, se muestra de especial relevancia puesto que nosotros hemos obtenido algunas discrepancias entre los resultados de incorporación y expulsión con el modulador PSC 833. La implicación clínica de estos experimentos puede ser discutible, al tratarse de condiciones experimentales, que son diferentes a las que se producen en los pacientes, pero permiten una aproximación muy precisa del estudio del fenómeno de la modulación de P-gp 170.

Los experimentos de incorporación en cuanto a la acción moduladora de PSC 833 proporcionaron los resultados esperados. Uno de los primeros puntos que analizamos, del mismo modo que se hizo en el caso de VRP, fue si PSC 833 podía producir una acción inespecífica sobre la membrana celular de nuestras células. Este hecho se descartó al observar que la acción de PSC 833 sobre las células sensibles no inducía variaciones en la cinética de incorporación de DNR. La ausencia de un aumento de fluorescencia intracelular en las células control, tras la incubación con el modulador, descarta que los cambios de dinámica de entrada y salida de DNR en la célula se deban a una acción de PSC 833 sobre otros factores implicados en este proceso como pueden ser modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular, alteración de la capacidad de DNR para distribuirse en las organelas citoplasmáticas o de otros procesos celulares implicados en el intercambio de sustancias con el medio extracelular.

A partir de los experimentos de incorporación realizados con el fin de evidenciar la acción moduladora completa de PSC 833 en el proceso de incorporación de DNR se obtuvieron una serie de resultados que a continuación comentamos. PSC 833 consigue aumentar la entrada de DNR en el interior de las células transfectadas, con relación a las mismas células sin modulador. Estas células incorporan aproximadamente 11 veces más DNR cuando se incuban con el fármaco. Además si se comparan con los niveles de fluorescencia de las células 3T3 sin modulador es posible estimar que la cantidad de DNR intracelular es similar a la que se acumula en el interior de las células sensibles. La

diferencia estimada entre los niveles de DNR acumulada en las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 y las células sensibles 3T3 es de -397 a 1464 UA. Este es un dato fundamental en la valoración de la capacidad moduladora de PSC 833, puesto que como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, fue uno de los parámetros establecido “a priori” por nuestro grupo para considerar una modulación completa del fenómeno MDR.

Otra de las condiciones básicas propuestas por nosotros para la valoración de la modulación era que la acción del fármaco a estudio fuera de una intensidad cercana a la de VRP. A través de estos experimentos observamos que PSC 833 es capaz de modificar la cinética de entrada de DNR en las células resistentes de un modo similar a VRP. Los canales medios de los histogramas de fluorescencia obtenidos en el equilibrio en los experimentos realizados con ambos fármacos son muy similares. La diferencia máxima estimada (al 95 %) de LFL3 entre las células 3T3-*mdr1* incubadas con PSC 833 y VRP es de -722 a 1034 UA, lo que supone menos de un 20 % de la media de intensidades. La mayor parte de autores aceptan que una diferencia menor de un 20 % entre los niveles máximos de fluorescencia entre dos tipos celulares o dos moduladores sobre el mismo tipo celular no tienen trascendencia en el fenómeno MDR. De estos resultados se desprende que, en nuestro modelo experimental, PSC 833 consigue realizar una acción moduladora sobre P-gp 170 en el proceso de llenado celular.

Pese a los resultados obtenidos con PSC 833 en los experimentos de incorporación, no obtuvimos resultados exactamente iguales en los experimentos de expulsión en cuanto a la modulación de la bomba. Los experimentos de expulsión se realizan secuencialmente a los de incorporación. Las condiciones del experimento fueron idénticas a las de los experimentos de incorporación tras el lavado celular y reincubación con medio libre de DNR pero con moduladores.

Los resultados permiten descartar una acción inespecífica de PSC 833 sobre la membrana celular, ya que no existen diferencias en la capacidad expulsora de DNR en las células sensibles en presencia o no de modulador. Los porcentajes de expulsión medios son similares: de un 32 % a un 35 %. Por otra parte se observa que PSC 833 modifica la capacidad expulsora de DNR en las células resistentes, pero no de forma completa. El porcentaje de expulsión de estas células en presencia de PSC 833, si bien se reduce puesto que desciende de un 78 % a un 47%, no llega a ser similar al de las células sensibles que es de un 32%. Esto nos lleva a considerar esta modificación no puede interpretarse como una modulación completa de la bomba en condiciones de laboratorio,

pero desconocemos, sin embargo, si esta modulación sería suficiente para revertir la quimiosensibilidad de las células resistentes. Además se puede observar que la reducción en la capacidad expulsora de las células 3T3-*mdr1* en presencia de PSC 833 no es tan intensa como la reducción producida por VRP. Se ha observado que VRP es capaz de reducir los porcentajes de expulsión de las células transfectadas hasta un nivel del 33.8 %. En ciertos experimentos la acción de PSC 833 sobre la capacidad de retención de DNR es más intensa que en otros, obteniéndose una modulación completa en algunos de ellos, pero estadísticamente, en el global de estudios realizados, los resultados son los que se han comentado.

A pesar de que nuestro grupo testó la concentración mínima moduladora de experimentos de incorporación y expulsión, creemos que esa falta de modulación completa en la expulsión puede deberse a que sean necesarias dosis más altas de fármaco para reducir el fenómeno de expulsión, puesto que en los experimentos iniciales realizados para la valoración de la dosis mínima con capacidad moduladora ya se evidencia que concentraciones elevadas de PSC 833 sí son capaces de revertir el fenómeno de expulsión de DNR. En otros trabajos, como el de Jiang y sus colaboradores, se demuestra que son necesarias dosis de 1-3 μM la eficacia de PSC 833 para reducir la salida de DNR en las células resistentes (Jiang *et al*, 1995). Sin embargo, Ludescher y su grupo, evidencian una acción moduladora de P-gp 170 por parte de PSC 833 en experimentos de expulsión a concentraciones tan solo de 0.1 μM (Ludescher *et al*, 1995). Ambos autores aplican el estudio de P-gp 170 y su modulación sobre modelos de laboratorio basados en líneas de células neoplásicas con fenotipo MDR inducido tras pases por quimioterápicos. Es posible que el hecho de que las células en las que se basa nuestro modelo, hayan adquirido el fenotipo MDR por un procedimiento de transfección del gen *mdr1*, sea una de las razones que pudieran explicar estos resultados discrepantes. La transfección puede conllevar la aparición de un gran número de moléculas de P-gp 170 en la membrana de las células, mayor del que se consigue tras la inducción con quimioterápicos. Es posible que para inhibir la acción expulsora de la bomba durante el llenado celular no sea necesario el bloqueo de la totalidad de moléculas de P-gp 170 de la membrana de las células, por lo que concentraciones bajas consiguen este efecto. Sin embargo, en los experimentos de expulsión y dado que la célula se encuentra repleta de DNR y la intensidad del gradiente de DNR entre el interior y exterior celular es diferente al de las condiciones de los

experimentos de incorporación, podría ser necesario que todas las moléculas de P-gp 170 estuvieran bloqueadas para conseguir un aumento en la capacidad de retención de DNR

Por otra parte, se sabe que en general la membrana de las células no es simétrica en cuanto a su capacidad para permitir el paso de sustancias. Es posible que en las células de nuestro modelo esté dificultada la salida de sustancias al exterior celular por las características propias de la membrana y por tanto se requieran un mayor bloqueo de la bomba expulsora para reducir la salida de DNR. De todas formas esta observación estaría en contra de los resultados obtenidos en los experimentos con VRP, en los que no existen diferencias de modulación en incorporación y expulsión con la utilización de las dosis mínimas con acción inhibitoria de P-gp 170 (10 μ M). PSC 833 puede tener distintas acciones sobre la fisiología celular además de la mera inhibición de P-gp 170, acciones que, aunque no estén relacionadas directamente con el transporte activo de sustratos de P-gp 170 y el fenotipo MDR, puedan modificar la permeabilidad de la membrana al paso de DNR. Por todo ello y a partir de los resultados que hemos obtenido no podemos explicar de una forma satisfactoria cuál es el motivo real de la falta de modulación de PSC 833 durante el desarrollo de la expulsión de DNR. Uno de los pasos claves para estandarizar al máximo los resultados de diferentes estudios puede ser la cuantificación de la expresión de P-gp 170 de las células sometidas a estudio.

Como conclusión de los resultados de nuestro trabajo, se puede admitir que PSC 833 es capaz de modular de forma específica la acción de P-gp 170. Se puede sostener esta afirmación porque, pese a la falta de modulación completa en los experimentos de expulsión, la modificación de la cinética de incorporación de DNR en las células transfectadas en presencia de este modulador es lo suficientemente importante como para considerar que la función de la bomba se ha inhibido de forma completa. Es decir que DNR ha llegado a sus puntos diana con una concentración similar a la conseguida en las células sensibles o las quimiorresistentes moduladas por VRP. La acción citotóxica va a ser, por lo tanto, similar en las tres condiciones experimentales descritas. El problema es la dificultad de mantenimiento de la concentración de este fármaco dentro de la célula cuando el medio extracelular se encuentra libre totalmente de DNR.

En la práctica clínica las concentraciones de quimioterápicos y moduladores a las que se ven expuestas las células neoplásicas son variables y dependen de factores como la farmacocinética y farmacodinámica de las drogas y de condiciones locales del tumor. En los experimentos de expulsión realizados en el laboratorio las células una vez han

conseguido el acúmulo máximo de DNR en su interior, se ven inmersas de forma brusca y modo artificial en un medio completamente libre de DNR. En las células cancerígenas de los pacientes con neoplasias no se dan estas condiciones experimentales. Tras la administración de un fármaco y su entrada en las células, la concentración extracelular de este fármaco se reduce de forma progresiva y no de forma brusca como en nuestro experimento. Ni en el caso de que la administración de moduladores se hiciera en forma de pulsos intermitentes se llegaría a una situación similar a la del laboratorio, aunque en cierto modo se asemejaría a estas condiciones en los momentos de valle de los niveles séricos del fármaco. Existen trabajos publicados por algunos autores que han comprobado que la administración intermitente de una sustancia moduladora a pacientes con neoplasias resistentes, en combinación con un protocolo de tratamiento quimioterápico, no es tan efectiva como la administración en infusión continua del modulador. De esta segunda forma se consigue que la acción del modulador sea estable y permanente durante la acción del tratamiento quimioterápico. Miller y colaboradores estudiaron el efecto de altas dosis de verapamilo en infusión continua asociado al tratamiento quimioterápico convencional en 18 pacientes con linfoma refractario al tratamiento, obteniendo un 42 % de respuestas favorables (Miller *et al*, 1991). Este estudio sirvió de base para un ensayo aleatorizado fase III (Dalton *et al*, 1994) que comparaba los resultados del tratamiento VAD frente a VAD junto con verapamilo en MM resistente o en recidiva. El tratamiento con verapamilo fue administrado por vía oral, alcanzándose niveles séricos de entre 150 y 400 ng/dl. Este estudio fue incapaz de demostrar un efecto beneficioso de la adición de verapamilo al tratamiento VAD. Se propusieron diferentes motivos que justificaran estos hallazgos, como: la existencia de otros mecanismos de resistencia distintos de P-gp 170, utilización de dosis insuficientes del modulador y la administración oral de VRP de forma discontinua. Estos autores citan que en estudios "in vitro" se demuestra que un modulador debe permanecer de forma continúa junto a las drogas quimioterápicas para poder ejercer su acción (Dalton *et al*, 1994). En cierto sentido nuestros resultados van a favor de esta hipótesis.

Hay grupos que están estudiando la actividad moduladora de PSC 833 en modelos experimentales. Nuestros resultados concuerdan con la opinión de la mayoría de autores en reconocer la actividad moduladora de PSC 833 en experimentos de laboratorio. Otros autores, han investigado o están investigando de una forma pragmática la aplicación "in vivo" de PSC 833 como modulador de MDR en la práctica clínica. Los primeros ensayos

clínicos fase I realizados apuntan a que se pueden alcanzar "in vivo" niveles plasmáticos suficientes para producir una modulación completa de P-gp 170 con escasos efectos secundarios. El grupo de Giaccone, en un estudio realizado en tumores sólidos consigue resultados satisfactorios con niveles plasmáticos de 1.8 a 4 μM (Giaccone *et al*, 1994). PSC 833 ha demostrado así mismo ser eficaz en el tratamiento del MM refractario, en combinación con el régimen VAD (ensayo clínico fase I realizado en 22 pacientes afectos de MM refractario a los diferentes tratamientos convencionales (Sonnenveld *et al*, 1996). En un reciente ensayo clínico fase I, Kornblau y sus colaboradores valoran la asociación de PSC 833 con mitoxantrone y etopósido en pacientes con leucemia mieloblástica aguda refractaria, evidenciándose un aumento en la actividad antileucémica, sin aumento en los efectos secundarios (Kornblau *et al*, 1997). De los resultados de estos estudios se desprende que la administración de PSC 833 a pacientes es posible, ya que no presenta importantes efectos secundarios a dosis bajas y que es posible su combinación con otros esquemas terapéuticos. Nuestros resultados, y los de otros autores, refuerzan la hipótesis de que el efecto beneficioso observado en estudios en pacientes neoplásicos con fenotipo MDR por parte de PSC 833 se debe a una inhibición específica de P-gp 170.

8.4.- TAMOXIFENO

Otro de los fármacos que se ha utilizado en nuestro trabajo es TMX, un antiestrógeno sintético, al que se le ha atribuido capacidad para modular la acción de P-gp 170. En 1984 se describió por primera vez su capacidad para revertir MDR en una línea celular de leucemia murina (P388) sin estar relacionada esta acción con su actividad antiestrogénica (Ramu *et al*, 1984). Posteriormente diferentes autores han demostrado que TMX es capaz de modular el fenómeno MDR, en experimentos de laboratorio (Berman *et al*, 1991, Leonessa *et al*, 1994). La mayoría de trabajos que evalúan la acción de TMX sobre MDR se han llevado a cabo sobre líneas celulares o muestras clínicas de leucemia y linfoma. Berman y su grupo examinan el efecto modulador de TMX y lo comparan con la acción de VRP, en un estudio funcional de MDR a través de la valoración de la dinámica de incorporación y expulsión de DNR, utilizando técnicas de CMF. Para ello utilizan líneas celulares de linfoma linfoblástico y de leucemia mieloblástica humanas con fenotipo MDR inducido tras pases con quimioterápicos. Estos autores reportan que TMX es capaz de revertir la acción de P-gp 170 de forma dosis-dependiente (utilizando concentraciones variables entre 10 y 50 μM). TMX muestra en estos experimentos un patrón de modulación

similar a VRP, es decir, modifica la cinética de incorporación y expulsión de DNR de una forma similar. Además, se descarta una posible acción inespecífica sobre la bomba dado que no modifica la cinética de DNR en las células sensibles. Estos autores realizan posteriormente ensayos clonogénicos para valorar el efecto tóxico real de TMX. No se evidencia una acción citotóxica directa de TMX sobre las células. Los mismos autores realizan posteriormente un ensayo clínico fase I para valorar la acción de TMX en combinación con DNR en pacientes con leucemia aguda refractaria y en recidiva. Se estudiaron sólo 14 pacientes, de los cuales 12 presentaban expresión de P-gp 170 en sus células tumorales. Se les administró diferentes dosis de TMX junto a una dosis fija de DNR. Los niveles plasmáticos máximos de TMX alcanzados correspondían a una concentración 7 μ M. No se observaron interacciones farmacocinéticas entre ambos fármacos ni efectos secundarios importantes aunque sólo se consiguió respuesta clínica en 2 de los enfermos (siendo uno de ellos P-gp 170 negativo). Con todo ello se concluyó que TMX podría ser un fármaco modulador con aplicación clínica pero que son necesarios estudios clínicos fase II para validar el beneficio real de TMX en estos enfermos (Berman *et al*, 1994).

Claudio y Emerman, en un estudio realizado en 1996, no observan efecto modulador de TMX sobre MDR. Estos autores basan su estudio de modulación en comprobar el aumento en la citotoxicidad de adriamicina en presencia de diferentes sustancias, unas con probada capacidad moduladora como ciclosporina A y otras problema como TMX y acetato de medroxiprogesterona. Para ello utilizan varias líneas de células epiteliales de cáncer de mama resistentes a adriamicina (unas P-gp positivas y otras P-gp negativas). La incubación tanto con ciclosporina A como con acetato de medroxiprogesterona produce un aumento en la toxicidad de adriamicina en las células P-gp positivas y no en las P-gp negativas mientras que TMX no tiene efecto en la quimiosensibilidad de ninguna de las líneas celulares.

Actualmente existen discrepancias entre los diferentes autores que han trabajado con TMX en cuanto a su capacidad moduladora sobre P-gp 170.

Nuestros resultados irían a favor de la opinión de los investigadores que defienden la falta de acción moduladora de TMX. Tras aplicar el modelo experimental desarrollado con el fin de valorar la capacidad moduladora de TMX sobre P-gp 170, observamos que en nuestro modelo experimental, TMX no es capaz de modular el fenómeno MDR de forma completa.

Para iniciar el estudio se utilizaron diferentes concentraciones de TMX, a partir de la información obtenida de la literatura (Berman *et al*, 1991). La concentración más pequeña utilizada fue 10 μM . Con esta dosis no se evidenciaron cambios en la acción de la bomba, por lo que no se pudo considerar ni siquiera una reversión parcial de la acción de P-gp 170. Los valores medios de los histogramas de fluorescencia obtenidos en el equilibrio de incorporación en las células transfectadas fueron muy inferiores a los obtenidos en las mismas células tras la incubación con VRP y los de las células sensibles. La siguiente concentración testada fue 50 μM consiguiéndose únicamente una inhibición parcial de la acción de la bomba expulsora. La cinética de incorporación de DNR en las células transfectadas, aunque se modificó en presencia de TMX a esta concentración, no fue suficiente para considerarlo como modulación. Además, a dosis tan elevadas como 100 μM y 200 μM , se evidenció una elevada mortalidad celular, tanto en las células resistentes como en las sensibles, lo que limitó la continuación del experimento y por tanto impidió la valoración real de la capacidad inhibidora de P-gp 170 por parte de TMX. La posibilidad de que el diluyente de TMX fuera el responsable de la elevada toxicidad celular se descartó tras realizar un experimento en paralelo con TMX disuelto en etanol y con etanol aislado a la concentración utilizada para la disolución de la droga. No se evidenció una toxicidad celular importante con el uso de etanol aislado. En todos los casos la acción moduladora de VRP fue completa, considerado como control positivo de modulación. Es posible, que para la modulación del fenómeno MDR en nuestras células se necesite una mayor concentración de TMX que la que habitualmente ha sido reportada por otros autores que utilizan líneas celulares con fenotipo MDR inducido por quimioterápicos. Además puede ser que la existencia de una mayor cantidad de moléculas de P-gp 170 en la membrana de las células transfectadas implique la necesidad de disponer de una mayor cantidad de moléculas de TMX para su bloqueo. Ante el fracaso en la valoración de la acción moduladora de este fármaco en nuestro modelo, ya en los primeros experimentos, consideramos oportuno no continuar con el estudio de TMX.

Otros autores no reportan toxicidad de TMX sobre las células a estudio aunque no hemos encontrado en la literatura revisada, trabajos en los que se hayan utilizado concentraciones mayores a 50 μM . Nosotros decidimos utilizar dosis tan elevadas como 100 y 200 μM al comprobar que, a las concentraciones a que se refiere la literatura y habitualmente utilizadas en otros trabajos, no obteníamos un efecto modulador valorable.

De los resultados de nuestro modelo experimental se desprende que TMX no es capaz de producir un efecto inhibitor de P-gp 170 en nuestras líneas celulares. De todas formas, y puesto que esta acción ha sido demostrada en varias ocasiones por otros autores no podemos afirmar que TMX no es capaz de modular MDR. Incluso se ha demostrado que TMX interacciona directamente con P-gp 170, uniéndose a su molécula e interfiriendo en su actividad como bomba expulsora de fármacos (Callaghan, 1995). No podemos explicar cual es la causa de la falta de capacidad inhibitor de TMX, dado que nuestro experimento no posee diferencias importantes con otros trabajos sobre este fármaco, a excepción de la línea celular en la que trabajamos. Hemos utilizado la forma citratada de TMX que es la forma utilizada por la mayoría de autores (Berman *et al*, 1991, Pu *et al*, 1996). Es posible que la configuración espacial de la molécula de P-gp 170 en la membrana de nuestras células no deje libres las zonas de acción para TMX y por tanto no se consiga una acción moduladora adecuada. Por otra parte, y dado que no ha sido posible valorar la acción de dosis mas elevadas, no podemos descartar que en nuestras células sean necesarias concentraciones mas altas del fármaco para inhibir la acción expulsora de la bomba (en relación con una alta densidad de moléculas de P-gp 170 en la membrana celular de las células transfectadas).

Una explicación posible para esta falta de modulación de TMX en nuestras células podría ser el hecho de que otros autores han sugerido que existen algunos fármacos que necesitan actuar en combinación con otras drogas para ejercer su actividad moduladora sobre P-gp 170. Entre estos fármacos se encuentra TMX (Ayesh *et al*, 1996). Ayesh y su grupo miden el efecto modulador de diferentes drogas, a través de un experimento funcional de acúmulo de DNR marcada con un isótopo radioactivo, en una línea celular de leucemia murina con fenotipo MDR (P388). Estos autores reportan que fármacos como VRP y ciclosporina A ejercen su efecto modulador de forma aislada. Sin embargo, TMX, quinidina, dipiridamol, y otros, requieren actuar en parejas, para, de una forma sinérgica, conseguir la reversión efectiva de MDR. Estos hallazgos se confirman en un estudio posterior por los mismos autores (Shao *et al*, 1997). Una de las interpretaciones es la existencia en la molécula de P-gp 170 de varios sitios para la modulación, que serían reconocidos de forma diferente por los distintos fármacos. Sería necesario, para conseguir una modulación completa de P-gp 170, actuar sobre las diferentes zonas de modulación de la molécula, lo que no sería posible utilizando uno de estos fármacos de forma aislada.

Otros autores que han demostrado un mayor efecto de TMX en combinación con otros moduladores son Kim y sus colaboradores. En este estudio se evidencia una acción moduladora sinérgica de TMX y ciclosporina A, a dosis que pueden ser administradas a pacientes. Estos autores realizan un estudio "in vitro" sobre una línea de hepatocarcinoma humano con fenotipo MDR (Kim *et al*, 1993).

8.5.- COMBINACION DE TAMOXIFENO Y PSC 833

Una de nuestras hipótesis de trabajo era que una combinación de tamoxifeno y PSC 833 podría tener una acción sinérgica, es decir que la utilización de ambos fármacos conseguiría el mismo efecto modulador sobre P-gp 170 a menores concentraciones de cada fármaco. Además, el fracaso que obtuvimos en los experimentos con TMX aislado llevó a un refuerzo esta hipótesis, por lo que decidimos realizar experimentos con una asociación de TMX y PSC 833 en busca de una acción sinérgica de ambos fármacos que tuviera como resultado la aparición del efecto modulador completo sobre P-gp 170.

Otros autores han utilizado asociaciones de fármacos con el fin de aumentar su capacidad moduladora y reducir su toxicidad. Para ello, los fármacos utilizados deben cumplir dos condiciones básicas: no deben presentar un incremento en su toxicidad y deben producir una acción quimiosensibilizante aditiva o sinérgica en las células tumorales resistentes.

Lehnert y sus colaboradores, en un estudio realizado en 1991 sobre un modelo basado en una línea celular de mieloma humano resistente a la doxorubicina (8226/DOX6), demostraron que la utilización combinada de verapamil y quinina, a dosis menores que las usadas de forma aislada, puede modular el fenómeno MDR en neoplasias humanas de célula B refractarias al tratamiento. El grupo de Berman demostró así mismo, un efecto sinérgico tras la utilización de dosis bajas de tamoxifen y verapamil, en una línea celular de leucemia mieloide humana resistente a la vincristina (HL-60/RV). Hu y sus colaboradores utilizaron verapamil y ciclosporina A, con buenos resultados, en líneas celulares de leucemia humana (Hu 1990).

El problema fundamental de estos estudios se basa en que la administración conjunta de sustancias moduladoras podría aumentar la toxicidad de las drogas citotóxicas en tejidos normales que expresen P-gp 170. Por otra parte, los moduladores podrían interferir con la eliminación renal o hepática de los quimioterápicos, produciendo unos niveles séricos elevados inesperados de estos fármacos.

En nuestro trabajo, para la realización de estos experimentos la dosis utilizada de TMX fue 50 μM se escogió la dosis máxima no moduladora pero que no produjera toxicidad celular. La dosis de PSC 833 fue 0.1 μM , una dosis inferior a la mínima moduladora con la finalidad de no enmascarar la acción de TMX.

Además de los experimentos realizados con la combinación de PSC 833 0.1 μM y TMX 50 μM , se realizaron experimentos de incorporación, con VRP 10 μM y PSC 833 0.5 μM como controles positivos de modulación. Todos los experimentos se realizaron en paralelo con células sensibles y resistentes. A partir de los datos obtenidos en este estudio pudimos observar que la combinación de TMX y PSC 833 0.1 μM no conseguía revertir de forma completa la acción de P-gp 170. Únicamente se evidenció una inhibición parcial de la bomba, de forma similar al efecto producido por TMX 50 μM de forma aislada, es decir que la asociación con PSC 833 no mejoró su capacidad como modulador. Sin embargo tanto VRP 10 μM como PSC 833 0.5 μM , fueron capaces de modificar la cinética de incorporación de DNR en las células resistentes de forma completa.

Con estos resultados observamos que, en nuestro modelo experimental, la asociación de TMX y PSC 833 no mejora la capacidad moduladora de estos fármacos utilizados por separado a las mismas concentraciones. Es posible que la utilización de TMX combinado con otras sustancias como VRP, ciclosporina A u otras tenga mejores resultados.

9.- LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

9.1.- LIMITACIONES

Para el estudio funcional del fenómeno MDR nuestro grupo ha adoptado una actitud explicativa, basándonos en un modelo de laboratorio que constituye la primera parte del trabajo expuesto en la Tesis. Una limitación de nuestro trabajo es que no hemos podido medir de forma exacta la concentración intracelular de DNR. Por ello, para saber si una modulación parcial es suficiente para revertir la quimiorresistencia de las células con fenotipo MDR sería necesaria la realización de ensayos clonogénicos con los que es posible medir la toxicidad real de los fármacos utilizados sobre las células. Además, es posible que el uso de líneas celulares transfectadas y por tanto con un gran número de moléculas de P-gp 170 en su membrana no sea del todo comparable a lo que ocurre en la

realidad clínica, en la que las células tumorales expresan cantidades menores y sobre todo variables de P-gp 170.

9.2.- PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han sido origen de nuevas preguntas y del desarrollo de nuevos proyectos y voluntades. Nuestro objetivo inmediato es continuar con el modelo experimental de que disponemos, para valorar la capacidad moduladora de otros fármacos. Probablemente trabajaremos con otros fármacos con demostrada acción moduladora, como ciclosporina A, para disponer de un control de positividad de modulación más amplio (junto a VRP). Nuestra idea es probar diferentes fármacos con posible capacidad moduladora, tanto en experimentos de incorporación como de expulsión. Una ventaja del modelo desarrollado es que puede ser aplicado al estudio de la capacidad moduladora de cualquier fármaco en condiciones de laboratorio. Es muy interesante continuar con el estudio de combinaciones de otros fármacos con capacidad moduladora, dado que pensamos que podría ser de gran utilidad clínica

El modelo experimental que se ha presentado es un paso previo y necesario para su aplicación en el estudio del fenómeno MDR en células neoplásicas de pacientes. Nuestro grupo está muy interesado en el estudio de la quimiorresistencia debida a P-gp 170 en neoplasias oncohematológicas, que son, por otra parte enfermedades en las que tiene gran repercusión el fenómeno MDR. De todas ellas actualmente se trabaja en muestras de pacientes con MM. En el MM es relativamente fácil identificar a las células tumorales, tanto desde el punto de vista morfológico como citométrico (expresan CD 38 en alta intensidad) por lo que será posible la realización de estudios multiparamétricos que serán de gran ayuda para estudiar a la población neoplásica en concreto, dentro de la heterogeneidad de la población celular de la médula ósea. Se pretende estudiar la presencia del fenotipo MDR en muestras de pacientes con MM tanto en el momento del diagnóstico como a lo largo de la evolución de la enfermedad. Con esta información sería posible, en un futuro obtener la información necesaria para adecuar el tratamiento quimioterápico de forma individualizada. De hecho ya hemos realizado estudios preliminares en muestras de pacientes con MM, con resultados esperanzadores pero con importantes dificultades, en la preparación de la muestra, en la separación de las células tumorales, en la posibilidad de mantener la viabilidad celular tras la congelación y sobre todo en la aplicación de un modelo experimental sobre una población celular muy heterogénea.

Los procedimientos citométricos que se han puesto a punto podrían ser aplicado al estudio del fenómeno MDR sobre líneas celulares que han adquirido este fenotipo tras pases sucesivos con quimioterápicos, con el fin de observar las diferencias y similitudes con nuestro modelo actual.