

(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**



RESUMEN

VIII.- RESUMEN

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La resistencia de las células tumorales al tratamiento quimioterápico es causa del fracaso terapéutico en los pacientes con enfermedades neoplásicas. Uno de los principales fenómenos ligados a esta resistencia farmacológica es la denominada resistencia múltiple a drogas (MDR). MDR está asociada a la expresión del gen *mdr1* que codifica una glicoproteína de membrana denominada P-gp 170, que actúa como bomba expulsora de fármacos impidiendo que se consigan concentraciones intracelulares citotóxicas. Muchos de los fármacos empleados para el tratamiento de las neoplasias hematológicas y tumores sólidos están involucrados en el fenómeno MDR, entre ellos antraciclinas, alcaloides de la vinca, y epipodofilotoxinas.

P-gp 170 se expresa en determinados tejidos normales, con predominio en aquellos formados por células epiteliales con función escretora (cortex adrenal, túbulos renales, canalículos biliares, trofoblastos placentarios, etc.). Su función fisiológica se ha relacionado con procesos de detoxificación celular, transporte hormonal y preservación de las barreras hemato-encefálica, testicular y feto-placentaria (Cordon-Cardo *et al*, 1990). Se sabe también que P-gp 170 se expresa en células pluripotenciales de médula ósea y en leucocitos normales de sangre periférica, predominando en células NK y linfocitos T supresores (relacionándose con su acción citotóxica) (Drach *et al*, 1992, Gupta *et al*, 1993).

Por otra parte, se conoce que la expresión de P-gp 170 es elevada en determinadas neoplasias hematológicas, y está relacionada con su falta de respuesta al tratamiento quimioterápico tanto al diagnóstico, como durante el tratamiento y en las recidivas (Pasman and Schouten, 1993). Se ha descrito en las crisis blásticas de la LMC, en LA tanto mielobástica como linfoblástica, en SLPC y LNH, en todas ellas relacionadas con la falta de respuesta al tratamiento y periodos cortos de remisión. En los enfermos con MM el fenómeno MDR es poco frecuente al diagnóstico, pero la expresión de P-gp 170 aumenta progresivamente en el curso del tratamiento, siendo responsable de la falta de respuesta al

final de la evolución de la enfermedad en un número elevado de pacientes (Sonnenveld *et al*, 1993)

Así mismo se ha relacionado la expresión de P-gp 170 en tumores sólidos, demostrándose en algunos de ellos, como el sarcoma de la infancia y neuroblastoma, un claro valor pronóstico (Chan *et al*, 1990, Chan *et al*, 1991)

Para el estudio de P-gp 170 existen diferentes métodos, que valoran este fenómeno a diferentes niveles, como el estudio genético (DNA y RNAm), la valoración inmunofenotípica utilizando anticuerpos monoclonales, y el estudio funcional (van der Heyden *et al*, 1995) El método más sensible para el estudio genético de P-gp 170 es la detección de RNAm a través de una técnica de RT-PCR (Noonan *et al*, 1990) El estudio cuantitativo de la expresión de P-gp 170 se basa en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos tanto internos (C219, JSB-1, y otros) como externos de la molécula (MRK-16, UIC2, 4E3 y otros). Estos últimos son los más utilizados puesto que para su uso no es necesario permeabilizar la membrana celular (Kartner *et al*, 1985) Se considera que el estudio funcional es el más importante puesto que resume la positividad del resto de niveles Además permite determinar si P-gp 170 puede ser inhibida por fármacos moduladores y valorar la acción moduladora de nuevos fármacos

El estudio funcional se basa en la valoración de la función de P-gp 170 como bomba expulsora de fármacos Para demostrar esta acción se puede medir el proceso de incorporación y expulsión de sustancias fluorescentes que sean sustratos de la bomba, como RH 123 y DNR

Para la valoración de los cambios en la fluorescencia intracelular la técnica más utilizada es la CMF, que se basa en el análisis celular individualizado, utilizando una suspensión celular en flujo laminar sobre la que incide un haz de luz láser (Shapiro, 1988) La dispersión de la luz es recogida por detectores, obteniéndose parámetros de tamaño y complejidad citoplasmática de las células Así mismo, si se utilizan colorantes fluorescentes o anticuerpos monoclonales específicos unidos a fluorocromos, se pueden medir a la vez parámetros de fluorescencia (Efferth *et al*, 1989)

Otras técnicas son los sistemas de análisis de imagen que valoran la diferente distribución intracelular de las sustancias fluorescentes en células con fenotipo MDR

Desde los experimentos de Tsuruo en 1981 es conocido que la acción P-gp 170 puede ser inhibida por diferentes sustancias denominadas moduladores de MDR (verapamilo, ciclosporina A y otros) Estas sustancias actúan fundamentalmente por un

mecanismo de inhibición competitiva de la unión de la droga citotóxica a P-gp 170, produciendo una mayor retención intracelular del fármaco, un aumento en su concentración a nivel de los puntos diana y por tanto una mayor acción citotóxica.

A pesar de los resultados obtenidos en experimentos de laboratorio, la aplicación clínica de los fármacos moduladores está limitada por sus elevados efectos secundarios a las dosis necesarias para ejercer su acción moduladora. Por otro lado, y dado que P-gp 170 se expresa en tejidos sanos, su bloqueo podría producir una alteración en la farmacocinética y biodisponibilidad del fármaco quimioterápico, apareciendo efectos secundarios más severos y no habituales en este tipo de fármacos (Lum and Gosland, 1995).

Si se dispusiera de moduladores aplicables en la práctica clínica se abriría una vía válida y eficaz para el tratamiento de pacientes con neoplasias que expresan MDR. Este es un tema que preocupa a diversos grupos de investigación y por ello se está trabajando en la búsqueda de nuevas sustancias o combinaciones de drogas conocidas que sean capaces de revertir MDR con buena tolerancia clínica (Twentyman *et al*, 1991; Jiang *et al*, 1995). Los denominados moduladores de "segunda" y "tercera generación" se han desarrollado específicamente con el fin de antagonizar la acción de P-gp 170 (SDZ PSC 833, SDZ 280-446, análogos de verapamilo, y otros)

Pero previamente a cualquier aplicación clínica de estos 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 para ser considerado de utilidad clínica, con los mínimos efectos secundarios.

La mayoría de trabajos de laboratorio se basan en líneas celulares de neoplasias humanas o de animales, a las que se les ha inducido el fenómeno MDR tras pases sucesivos con diferentes fármacos antineoplásicos. En estas células, aunque se puede demostrar y cuantificar la presencia de P-gp 170, no se puede descartar que en los estudios funcionales no estén actuando otros mecanismos de resistencia distintos como MRP, LRP u otros todavía desconocidos. Por otra parte, la utilización de células neoplásicas extraídas de pacientes enfermos de cáncer tras el tratamiento quimioterápico presenta un problema similar, dado que en estas células se han podido desarrollar varios mecanismos de resistencia de forma simultánea.

En este estudio se presentan los resultados de un proyecto de investigación en el que se pretendía desarrollar un modelo experimental, basado en líneas celulares transfectadas con el gen *mdr1* y en técnicas de CMF. A través de este modelo se debería poder estudiar el fenómeno MDR desde un punto de vista funcional, de una forma específica, reproducible y estandarizada, así como su modulación en diferentes condiciones experimentales y por diferentes sustancias aisladas y en combinación.

2.- MATERIAL Y METODOS

Para poner en marcha el modelo experimental se necesitan células con fenotipo MDR, células salvajes o control, sustancias fluorescentes que sean sustratos de P-gp 170, drogas con acción moduladora conocida y un método de medida de fluorescencia. Una vez validado el modelo se continuará el estudio con la valoración de nuevas sustancias potencialmente moduladoras de MDR.

2.1. Líneas celulares: Disponemos de una línea celular continua de fibroblastos denominada NIH-3T3, derivada de cultivos de embrión de ratón NIH Swiss, que se demuestra sensible a la acción de los quimioterápicos y que utilizaremos como control de genotipo MDR negativo (Shen *et al*, 1986). Disponemos así mismo de una sublínea celular obtenida a partir de formada por una clona de células que presentan resistencia múltiple a drogas (NIH 3T3-*mdr1*) tras haber sido transfectadas de forma permanente con un vector retroviral del gen *mdr1* humano (pHaMDR1/A -G185) por el método de co-precipitación con fosfato cálcico.

Estas células nos han sido proporcionadas por el Dr. Gerard Mintening, del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de Lleida.

El mantenimiento y cuidado de las líneas celulares se ha realizado en la Unidad de Cultivos Celulares del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de Lleida. Las líneas celulares se encuentran criopreservadas en nitrógeno líquido, con dimetilsulfóxido (DMSO) como conservante. El medio utilizado para su crecimiento es Doulbeco Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D-5648), enriquecido con un 10 % de suero fetal bovino, 3,7 gramos de bicarbonato sódico (Sigma S-5761) y antibióticos (20 mgrs de estreptomycin y 20000 uu de penicilina). Las células tienen un crecimiento en monocapa (placas Corning), y se mantienen en estufa a 37 °C con aire humidificado suplementado con 5 % de CO₂ requiriendo cambios de medio de cultivo cada 48 horas y realización de

subcultivos (habitualmente cada 48-72 horas). Las suspensiones celulares se obtienen fácilmente por una técnica de tripsinización rápida.

Para demostrar la adecuada viabilidad de las células se realiza un test con yoduro de propidio (Coulter® DNA-Prep). Se ha considerado un mínimo del 90 % de células viables para considerar válidos los experimentos.

La expresión de P-gp 170 en las células transfectadas y su ausencia en las células sensibles se ha demostrado de forma permanente a través de una técnica de inmunofluorescencia indirecta por CMF, utilizando el anticuerpo monoclonal 4E3.

2.2. Fármacos: Las sustancias fluorescentes utilizadas como sustratos de P-gp 170 son:

- Rodamina 123: colorante supravital catiónico. Concentración final 5 μM (solución madre 50 μM)
- Daunorrubicina: antibiótico antitumoral antraciclínico. Concentración final 2 μM (solución madre 20 μM).

Los fármacos moduladores que se han utilizado son:

- Verapamilo: Bloqueante de los canales de calcio. Concentraciones finales 1 μM , 5 μM , 10 μM y 20 μM (solución madre 100 μM)
- Tamoxifeno: Antiestrógeno sintético. Concentraciones finales 10 μM , 50 μM , 100 μM y 200 μM (solución madre 200 μM).
- SDZ PSC 833: Análogo no inmunosupresor de ciclosporina D. Concentraciones finales 0.1 μM , 0.2 μM , 0.5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM y 50 μM . (soluciones madre 20 μM y 840 μM).

2.3. Citómetro de flujo. Tests específicos: Como citómetro de flujo se emplea un EPICS PROFILE I (Izasa-Coulter) (luz a 488 nm de 15 mW, tres PMT, discriminador de dobletes) implementado con el paquete "Power Pack" (cuarto fotomultiplicador, histogramas logarítmicos de cuatro décadas, discriminador de señal de pico), lo que equivale a convertirlo a PROFILE II (más otro fotomultiplicador). Es un citómetro de cámara cerrada sin sorter.

En determinados experimentos se ha empleado citómetros de adquisición continua como son FACScan y FACS Vantage (Becton Dickinson).

Diariamente, antes de proceder a la lectura, se realiza una calibración del alineación del sistema, con bolas fluorescentes de látex (Calibrite® Beads, Becton -Dickinson), con el fin de estandarizar las mediciones.

Se han creado tests específicos para los distintos estudios

- Test para el estudio de acúmulo de fármacos en el interior celular Para valorar la cantidad de fluorescencia intracelular nos basamos en un histograma monoparamétrico de fluorescencia en relación con el número de células En los experimentos con DNR la emisión de luz fluorescente se mide en el espectro amarillo-rojo y de forma logarítmica (LFL3) porque la señal es débil Se realizan lecturas sucesivas en diferentes tiempos valorándose las modificaciones en fluorescencia en cada momento, que serán debidas a la mayor o menor retención de fármaco fluorescente en el interior celular Este test se aplica tanto en estudios de incorporación como en estudios de expulsión
- Test de viabilidad celular Estos tests se basan en la utilización de yoduro de propidio (Coulter[®] DNA-Prep) Se ha utilizado un test basado en la cuantificación de DNA por CMF (histograma de DNA en FL3)
- Test para el conteo celular Con el fin de asegurar que trabajamos con igual número de células en todos los experimentos (0.5×10^6 células por tubo), y dado que el citómetro de flujo no proporciona conteos celulares absolutos, hemos utilizado un método de conteo exacto basado en el uso de tubos especiales que contienen una cantidad conocida de pequeñas bolas fluorescentes (Trucount[®] absolute count tubes Becton-Dickinson)
- Test para la detección cuantitativa de P-gp 170 A través de una técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal 4E3

2.4. Diseño del estudio: Los primeros experimentos se realizaron utilizando RH 123 como sustancia fluorescente con buenos resultados pero con el problema de que su intensa fluorescencia dificultaba la realización de estudios multiparamétricos Por ello se decidió realizar el trabajo definitivo con DNR ya que su menor intensidad en la emisión de fluorescencia era suficiente para nuestro experimento y no interfería con otros estudios, obteniendo también muy buenos resultados

Con el fin de definir la cinética de incorporación DNR en las células y la capacidad del modelo experimental para valorar dicha incorporación, realizamos un primer estudio en las células salvajes (3T3) Se realiza una medida de fluorescencia basal previa a la adición de DNR Posteriormente se realizan medidas de fluorescencia secuenciales, durante un tiempo predeterminado hasta llegar al equilibrio A partir de estas determinaciones por CMF se obtienen diferentes histogramas en LFL3 Utilizando sus valores medios se construyen curvas de cinética de incorporación de DNR intracelular

Con el objetivo de comprobar que el procedimiento citométrico desarrollado para el estudio de la cinética de incorporación de DNR en las células 3T3 es suficientemente sensible para evidenciar la existencia del fenómeno MDR en las células 3T3-*mdr1* se realizan estudios de incorporación de DNR de forma paralela en los dos tipos celulares. La comparación entre las curvas que se obtengan en ambos tipos celulares nos permite valorar las diferencias que existen entre las cinéticas de incorporación de DNR en relación con el tipo celular.

Para valorar si P-gp 170 puede ser inhibida y si nuestro modelo es capaz de evidenciarlo, realizamos estudios de incorporación añadiendo una droga moduladora bien conocida como verapamilo. En este experimento se comparan las curvas de incorporación de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* con y sin modulador.

Para optimizar el experimento fue necesario determinar previamente el tiempo de incubación con el modulador necesario para ejercer su acción así como la concentración óptima para inhibir P-gp 170. Los resultados de estos experimentos muestran que la concentración óptima de VRP para ejercer su acción moduladora es 10 μM y que es suficiente con 15 minutos de incubación. Con estos datos se realizan de forma repetida y en idénticas condiciones, experimentos de modulación con VRP.

Los estudios de expulsión se basan en valorar la capacidad celular de retención de la sustancia fluorescente tras lavar las células (eliminando el medio que contiene sustancia fluorescente) y resuspenderlas en medio carente de DNR, pero conteniendo la concentración de modulador que le corresponde a cada tubo. Estos estudios se realizan a continuación del estudio de incorporación, es decir partiendo de una concentración intracelular de fármaco fluorescente máxima para cada tipo celular.

Una vez validado el modelo con el uso de VRP, este modelo experimental puede aplicarse para el estudio de la actividad moduladora sobre P-gp 170 de otros fármacos como tamoxifeno y PSC 833. Para ello se realizan estudios previos que valoran las concentraciones mínimas de cada fármaco para ejercer la acción moduladora. Con esta información se realizan experimentos de incorporación y expulsión en paralelo en las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, en presencia o no de la sustancia moduladora (metodológicamente idénticos a los realizados previamente con VRP). Todos los experimentos se realizan de forma paralela con VRP, que se considera control positivo de modulación.

2.5. Recogida de datos y análisis de los de resultados: Las variables que se han considerado en el estudio son:

- identificación del experimento: fecha, operador y nº de experimento.
- tipo celular: 3T3 y 3T3-*mdr1*.
- modulador: ausencia, verapamilo, PSC 833, tamoxifeno, combinaciones
- canal de fluorescencia: basal o previo a DNR, inmediato post-DNR, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos, inmediato post-lavado, 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Expresado como canal medio del histograma de LFL3 (dato que proporciona el software del citómetro) en unidades arbitrarias.
- porcentaje de expulsión
- porcentaje de células que incorporan yoduro de propidio: mortalidad celular

Estos datos son transcritos a una base de datos informatizada y a partir de ellos se construyen las gráficas de las cinéticas de incorporación y expulsión.

Se ha considerado que los fármacos a estudio consiguen una modulación completa de la acción expulsora de DNR por parte de P-gp 170 cuando no se han encontrado diferencias significativas entre los niveles de LFL3 conseguidos por estos fármacos y los conseguidos por VRP en las diferentes condiciones experimentales en las células 3T3-*mdr1*. Además, no deben existir diferencias significativas entre los resultados de las células 3T3-*mdr1* con modulador y las células 3T3. Un aumento en los niveles de LFL3 en las células 3T3-*mdr1* que no cumple las condiciones anteriores se ha considerado una modulación parcial.

Las comparaciones estadísticas se realizan de forma distinta en los experimentos de incorporación y de expulsión: En los experimentos de incorporación, dado que no existen diferencias en los niveles de fluorescencia basales en ambos tipos de células, las comparaciones de las cinéticas de incorporación se han realizado empleando los valores de fluorescencia en el equilibrio de incorporación (60 min post- incubación con DNR).

En los experimentos de expulsión, dado que el nivel de fluorescencia del que se parte es diferente en cada tipo y situación celular, hemos decidido valorar el "porcentaje de expulsión", que se obtiene de la comparación entre la fluorescencia intracelular tra los 60 minutos del lavado y la fluorescencia máxima de la incorporación.

Para las comparaciones se emplean las pruebas siguientes: t de Student y/o análisis de la varianza (se realiza la estimación con IC al 95 % de las diferencias entre las variables).

3. RESULTADOS

3.1.- Estudio de la expresión de P-gp 170 en las células del modelo: Los resultados obtenidos muestran claramente la ausencia de positividad para 4E3, y por lo tanto la ausencia de P-gp 170 en la membrana de las células 3T3

Las células 3T3-*mdr1* expresan una alta positividad para 4E3 (20-24 veces más intensa que las sensibles), lo que demuestra la presencia de P-gp 170 en su membrana

3.2.- Comparación entre las cinéticas de incorporación y expulsión de las células 3T3 y 3T3-*mdr1*: 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* es significativamente inferior al de las células 3T3 ($p < 0,0005$) La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 7412 8 UA y el IC 95 % de la diferencia es de 6791 7 a 8033 8 Es decir las células sensibles acumulan aproximadamente 12 veces más DNR que las resistentes

El valor medio de los porcentajes de expulsión, obtenidos a los 60 minutos tras el lavado, en las células 3T3-*mdr1* es significativamente inferior al de las células 3T3 ($p < 0,0005$) La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 46 1% y el IC 95 % de la diferencia es de 43 4 a 48 8% Es decir, las células resistentes tienen mayor capacidad de expulsión de DNR

3.3- Estudio de modulación con verapamilo: Los experimentos de valoración de concentración y tiempo de incubación demuestran que la dosis mínima de VRP que consigue una modulación de P-gp 170 completa es 10 μM y que es suficiente con 15 minutos de incubación con el modulador

3.3.1- Experimentos de incorporación: 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 no es significativamente diferente al de las células 3T3+VRP ($p = 0 1010$) La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 805 5 UA, y el IC de la diferencia es de -168 2 a 1779 2 UA Es decir, VRP no induce un mayor acúmulo de DNR en las células 3T3

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* es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1*+VRP ($p = 0 0005$) La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 6683 4 UA, y el IC 95% de la diferencia es de 6044 0 a 7322 9 UA Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con VRP induce un mayor acúmulo de DNR (en comparación de las mismas células sin modulador)

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*+VRP no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ($p=0.4010$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 377.7 UA, y el IC 95 % de la diferencia es de -531.3 a 1286.7 UA. Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con VRP 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). Lo mismo se cumple en caso de comparar con las células 3T3 en presencia de VRP (no mostramos los datos).

3.3.2.- Experimentos de expulsión: El valor medio de los porcentajes de expulsión medidos a los 60 minutos en las células 3T3 no es significativamente diferente al de las células 3T3+VRP ($p=0.1070$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 2.73 %, y el IC 95 % de la diferencia es de -0.63 a 6.10 %. Es decir, la expulsión de DNR en las células 3T3 no se modifica en presencia de un modulador de MDR.

El valor medio de los porcentajes de expulsión en el experimento medidos a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1*+VRP ($p=0.0005$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 44.31%, y el IC 95 % de la diferencia es de 40.40 a 48.23 %. Es decir, las células transfectadas, en presencia de VRP, reducen su capacidad expulsora de DNR hasta aproximadamente la mitad que en las mismas células sin VRP.

El valor medio de los porcentajes de expulsión medidos a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1*+VRP no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ($p=0.4110$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 10.79 %, y el IC 95 % de la diferencia es de -2.61 a 6.19 %. Es decir, que las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP tienen una capacidad expulsora de DNR similar a la de las células 3T3 sin modulador.

3.4.-Estudio de modulación con SDZ PSC 833: Los experimentos de valoración de concentración demuestran que la dosis mínima de PSC 833 que consigue una modulación de P-gp 170 completa es 0.5 μ M.

3.4.1.-Experimentos de incorporación: 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, 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 acúmulo de DNR en las células sensibles.

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 es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1* sin modulador ($p=0.0850$). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 6527.6, 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.

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 cantidad de fluorescencia 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). Lo mismo se cumple en caso de comparar con las células 3T3 en presencia de PSC 833 (no mostramos los datos).

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 (que actúa como control positivo de modulación).

3.4.2.-Experimentos de expulsión: 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.

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.

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 que PSC 833 no modifica de una forma completa la dinámica de expulsión de DNR en las células transfectadas.

El valor medio de los porcentajes de expulsión medido a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1*+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 (considerado como control positivo de modulación).

3.5. Estudio de modulación con tamoxifeno: Se han realizado experimentos de incorporación de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, para valorar la concentración mínima de tamoxifeno necesaria para modular. En paralelo se ha realizado un experimento con VRP 10 μM , que sirve de control positivo de modulación. Como resultados del experimento se evidencia que tamoxifeno a dosis de 10 μM y 50 μM no es capaz de modular la acción de P-gp 170 de forma completa. Cuando se utiliza a dosis superiores (100 μM y 200 μM) produce una elevada mortalidad celular que impide la valoración del experimento.

3.6.- Estudio del efecto de la combinación de PSC 833 y tamoxifeno: La combinación de PSC 833 a dosis inferiores a las mínimas con capacidad para modular (0.1 μM) y tamoxifeno a dosis de 50 μM (dosis máxima tolerada por las células) consigue una modulación parcial de P-gp 170, llegando únicamente a niveles de fluorescencia de un 50 % menos que las células transfectadas con VRP 10 μM y que las células control. Es decir, no mejora la capacidad moduladora de TMX de forma aislada.

4.- 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, de un modo objetivo, reproducible y estandarizable. A través del modelo experimental puesto a punto 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 sustrato fluorescente de la bomba, como es DNR, y

las lecturas se han realizado secuencialmente 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 repetidamente mediante el anticuerpo monoclonal 4E3. Este anticuerpo está dirigido contra un epítipo externo de la molécula y no interfiere en la función de la bomba, permitiendo la realización de estudios funcionales simultáneamente.

La ventaja del estudio funcional de MDR es que probablemente es el más adecuado puesto que enfoca el fenómeno de una forma global y permite realizar estudios de modulación. Esta opinión es compartida por muchos grupos de investigación que trabajan sobre MDR. Nuestra aproximación al estudio de P-gp 170 se basa en la utilización de líneas celulares que han adquirido el fenotipo MDR por un procedimiento de transfección, lo que permite asegurar el estudio específico de la función derivada de la expresión del gen *mdr1*, evitándose interferencias con otros fenómenos de resistencia. Este es uno de los puntos fundamentales de nuestro trabajo, que lo diferencia de los trabajos que utilizan líneas celulares con fenotipo MDR inducido por fármacos o células neoplásicas de pacientes.

La validación del modelo, una vez comprobada su capacidad para valorar el fenómeno MDR, se ha realizado a través del estudio de la capacidad moduladora de VRP, un fármaco con reconocida acción moduladora. Los resultados de los experimentos muestran que concentraciones de VRP a 10 μM consiguen una reversión completa de la quimiorresistencia dependiente de P-gp 170, equiparando las cinéticas de incorporación y expulsión de las células transfectadas a las cinéticas de las células salvajes. Estos resultados están en concordancia con lo publicado por otros autores.

Posteriormente se ha aplicado el modelo para el estudio de la capacidad moduladora de otros fármacos como PSC 833 y TXM.

PSC 833 a concentraciones a partir de 0.5 μM ha mostrado, en nuestro modelo, una capacidad moduladora completa en los estudios de incorporación aunque sólo ha producido una modulación parcial en los de expulsión. Creemos que probablemente este hecho se deba a diferencias en la simetría de la membrana o a que son necesarias dosis más elevadas del fármaco para modular en el proceso de expulsión. Las concentraciones PSC 833 consideradas por otros autores como las mínimas con capacidad moduladora son muy variables, desde 0.1 a 3 μM . Estas discrepancias pueden deberse a que los distintos grupos trabajan sobre diferentes modelos de laboratorio o muestras neoplásicas,

empleando además diferentes condiciones de estudio y métodos de medición del fenómeno

TMX a las dosis utilizadas, únicamente ha producido una modulación parcial de la acción de la bomba, dando lugar a una elevada mortalidad celular a dosis elevadas. Estos resultados no concuerdan con la opinión de algunos autores que reportan que TMX es un buen modulador de MDR, aunque en general los resultados son muy heterogéneos. Sin embargo, otros autores obtienen resultados similares a los de nuestro trabajo, en el sentido de que TMX no produce una inhibición completa de la función de P-gp 170. Algunos fármacos, entre los que algunos investigadores incluyen a TMX, necesitan actuar en parejas para producir modulación. En nuestros experimentos, la asociación de PSC 833 y TMX a dosis de 0.1 μM y 50 μM respectivamente sólo mostró una inhibición parcial de la función de la bomba similar a producida por TMX 50 μM de forma aislada.

En conclusión, el modelo experimental desarrollado por nuestro grupo permite el estudio funcional de P-gp 170. Permite valorar la capacidad de P-gp 170 de ser inhibida de forma extrínseca y el estudio de la acción moduladora de fármacos. El hecho de que la única diferencia entre las células resistentes y sensibles sea la existencia de la bomba expulsora en la membrana permite asegurar que el estudio es específico de P-gp 170, sin interferencia de otros mecanismos de resistencia. PSC 833 ha demostrado en nuestro modelo, ser capaz de modular en experimentos de incorporación la acción de P-gp 170, de forma similar a VRP, utilizando dosis tan bajas como de 0.5 μM . De todos modos pensamos que clínicamente la modulación puede ser suficiente porque DNR llega a sus puntos diana de forma similar a la conseguida en las células sensibles o quimiorresistentes moduladas con PSC 833. En nuestro modelo, tamoxifeno no ha sido capaz de modular la acción de P-gp 170 a dosis de 50 μM . Dosis superiores provocan una toxicidad celular masiva. La combinación de dosis inframoduladoras de PSC y tamoxifeno a dosis no tóxicas produce en nuestro modelo tan sólo una inhibición parcial de la bomba.

CONCLUSIONES

IX.- CONCLUSIONES

1.- El modelo experimental desarrollado permite estudiar el fenómeno MDR atribuible específicamente a la acción de P-gp 170 desde un punto de vista funcional.

El hecho de que la única diferencia entre las células transfectadas y las sensibles sea la existencia o no de P-gp 170, permite descartar que las diferencias encontradas en el estudio funcional entre ambos tipos celulares se deben a otros factores que la acción de esta bomba, sin existir interferencias con otros mecanismos de resistencia farmacológica.

2.- El modelo permite evidenciar la capacidad para modular específicamente la acción de P-gp 170 por parte de moduladores de la bomba. En nuestro modelo se comprueba que verapamilo a una concentración 10 μ M es capaz de inhibir la acción de P-gp 170 de una forma completa y dosis-dependiente, evidenciándose así mismo un fenómeno de saturación de la modulación con dosis superiores.

El efecto modulador de VRP se ha demostrado tanto en experimentos de incorporación como de expulsión.

3.- PSC 833 a partir de una concentración de 0.5 μ M en los experimentos de incorporación es capaz de modular la acción de P-gp 170 de forma completa y específica. Su acción moduladora es comparable a la de verapamilo a dosis de 10mM.

En los experimentos de expulsión no hemos objetivado una inhibición completa de la expulsión activa de daunorrubicina.

4.- Para el estudio funcional de P-gp 170 es conveniente realizar estudios de incorporación y de expulsión de forma simultánea. Los experimentos de incorporación/expulsión proporcionan una visión más sensible y amplia de la acción de fármacos moduladores sobre la acción de la bomba.

5.- Tamoxifeno a concentración de 10-50 μ M únicamente produce una acción moduladora parcial de la acción de P-gp 170. Su acción sobre la bomba a dosis superiores



a no puede ser comprobada, en nuestro modelo, porque produce una intensa toxicidad celular.

6.- La combinación de PSC 833 a dosis inferiores a las mínimas con capacidad moduladora (0.1 mM) con tamoxifeno a dosis no citotóxicas (50 mM) produce una inhibición parcial de la acción de P-gp 170. En nuestro modelo, el uso combinado de tamoxifeno y PSC 833 a las dosis utilizadas no produce un incremento en la capacidad moduladora de la acción de P-gp 170 por parte de tamoxifeno empleado de forma aislada.

7.- La valoración inmunofenotípica por CMF de P-gp 170 en las células del modelo con el anticuerpo monoclonal 4E3 demuestra la expresión continuada y estable de niveles elevados de la glicoproteína en las células transfectadas durante toda la realización del proyecto.

BIBLIOGRAFIA

X.- BIBLIOGRAFIA

- 1 - Akiyama, S , Cornwell, M M , Kuwano, M , *et al* (1988) Most drugs that reverse multidrug resistance inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog *Mol Pharmacol*, 33, 144-147
- 2 - Arceci, R J , Stieglitz, K , Bras, J , Schinkel, A , Baas, F and Croop, J (1993) Monoclonal antibody to an external epitope of the human *mdr1* P-glycoprotein *Cancer Res* , 53, 310-317
- 3 - Archinal-Mattheis, A , Rzepka, R W , Watanabe, *et al* (1995) Analysis of the interactions of SDZ PSC 833 ([3'-keto-Bmt1]-Val2]-Cyclosporine), a multidrug resistance modulator, with P-glycoprotein *Oncol Res*, 7 12, 603-610
- 4 - Ayesch, S , Shao, Y M and Stein, W D (1996) Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein *Biochim Biophys Acta*, 1316 1, 8-18
- 5 - Bates, S E , Zhan, Z , Dickstein, *et al* (1994) Review Reversal of multidrug resistance *Journal of Hematotherapy*, 3, 219-223
- 6 - Beck, W T , Mueller, T J and Tanzer, L R (1979) Altered surface membrane glycoproteins in Vica alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts *Cancer Res*, 39, 2070-2076
- 7 - Beck, J , Gekeler, V , Ringger, M , Handgretinger, R and Niethammer, D (1996) Rhodamine 123-efflux from hematopoietic subpopulations marked by PerCP-conjugated monoclonal antibodies *Cancer Lett* 99 2, 197-207
- 8 - Bellamy, W T , Dalton, W S , Kailey, J M , *et al* (1988) Verapamil reversal of doxorubicin resistance in multidrug-resistant human myeloma cells and association with drug accumulation and DNA damage *Cancer Res*, 48 63, 65-70
- 9 - Bellamy, W T , Dalton, W S and Dorr, R T (1990a) The clinical relevance of multidrug resistance *Cancer Invest*, 8, 547-562
- 10 - Bellamy, W T (1990b) Multidrug resistance in human tumors (Review) *Curr Opin Oncol*, 2, 1126-1132
- 11 - Bellamy, W T (1996) P-glycoproteins and multidrug resistance *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 161-183
- 12 - Berman, E , Adam, M , Duigou-Ostendorf, R , Godfrey, L , Clarkson, B and Andreeff, M (1991) Effect of tamoxifen on cell lines displaying the multidrug-resistant phenotype *Blood*, 77, 818-825
- 13 - Berman, E and Mc Bride, M (1992) Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug-resistant leukemia cells *Blood*, 79 12, 3267-3273

- 14 - Berman, E , Mc Bride, M and Tong, W (1994) Comparative activity of tamoxifen and N-desmethyltamoxifen in human multidrug resistant leukemia cell lines *Leukemia*, 8 7, 1191-1196
- 15 - Berman, E , Mc Bride, M , Lin, S , Menendez-Botet, C and Tong, W (1995) Phase I trial of high-dose tamoxifen as a modulator of drug resistance in combination with daunorubicin in patients with relapsed or refractory acute leukemia *Leukemia*, 9, 1631-1637
- 16 - Biedler, J L and Riehm, H (1970) Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies *Cancer Res*, 30, 1174-1184
- 17 - Biedler, J L (1991) Genetic aspects of multidrug resistance *Cancer (supplement)*, 70 6, 1799-1809
- 18 - Biedler, J L (1992) Genetic aspects of multidrug resistance (Review) *Cancer*, 70, 1799-1809
- 19 - te Boekhorst, P A W , de Leew, K , Schoester, M , *et al* (1993) Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34⁺ acute myeloid leukemia cells *Blood*, 82, 3157-3162
- 20 - Boesch, D , Gaveriaux, C , Jachez, B , Pourtier-Manzanedo, A , Bollinger, P and Loor, F (1991a) In vivo circumvention of P-glycoprotein mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833 *Cancer Res*, 51, 4226-4233
- 21 - Boesch, D , Muller, K , Pourtier-Manzanedo, A and Loor, F (1991b) Restoration of daunomycin retention in multidrug-resistant P388 cells by submicromolar concentrations of SDZ PSC 833, a nonimmunosuppressive cyclosporin derivative *Exp Cell Res*, 196, 26-32
- 22 - Boiron, J M , Belloc, F , Montastruc, *et al* (1994) Daunorubicin (DNR), accumulation in fresh leukemic cells Correlation with clinical and biological features *Leukemia Lymphoma*, 13, 291-296
- 23 - Boote, D J , Dennis, I F , Twentyman, P R , *et al* (1994) A phase I study of intravenous SDZ PSC 833 in patients with advanced Cancer *Ann Oncol*, 5, 159
- 24 - Breuninger, L M , Saptarshi, P and Gaughan, K (1995) Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution *Cancer Res*, 55, 5342-5347
- 25 - Brophy, N A , Marie, J P , Rojas, *et al* (1994) *Mdr1* gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemias and lymphomas Evaluation by four techniques *Leukemia*, 8 2, 327-335
- 26 - Broxterman, H J , Versantvoort, C H M and Linn, S C (1994) Multidrug resistance in lung Cancer Chapter 10 in Heine H Hansen, (ed), Hansen Lung Cancer Kluwer Academic Publishers, 193-222
- 27 - Broxterman, H J , Sonnenveld, P , Feller, *et al* (1996) Quality control of multidrug resistance assays in adult acute leukemia correlation between assays for P-glycoprotein expression and activity *Blood*, 87 11, 4809-4816

- 28 - Callaghan, R (1995) Interaction of Tamoxifen with the MDR P-gp British Journal Cancer, 71 2, 244-249
- 29 - Campos, L , Guyotat, D , Jaffar, C , Solary, E , Archimbaud, E and Treille, D (1992a) Correlation of *MDR1/P-170* expression with daunorubicin uptake and sensitivity of leukemic progenitors in acute myeloid leukemia Eur J Haematol, 48, 254-258
- 30 - Campos, L , Guyotat, D , Archimbaud, *et al* (1992b) Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphocytic leukemia cells at diagnosis Blood, 79 2, 473-476
- 31 - Cardarely, C O , Aksentijevich, I , Pastan, I and Gottesman, M M (1995) Differential effects of P- glycoprotein inhibitors on NIH-3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters Cancer Res, 55 5, 1086-1091
- 32 - Carslen, S V , Till, J E , and Ling, V (1977) Biochim Biophys Acta 467, 238-250
- 33 - Casciato, D A , and Lowitz, B B (1983) Manual of Bedside Oncology Little, Brown and Company Boston Toronto
- 34 - Center, M S (1993) Non-P-glycoprotein multidrug resistance in cell lines which are defective in the cellular accumulation of the drug Cytotechnology, 12, 109-125
- 35 - Claudio, J A and Emerman, J T (1996) The effects of cyclosporin A, tamoxifen and medroxyprogesterone acetate on the enhancement of adriamycin cytotoxicity in primary cultures of human breast epithelial cells Breast Cancer Res Treat, 41 2, 111-122
- 36 - Cole, S P C , Bhardwaj, G , Gerlach, *et al* (1992) Overexpression of a transport gene in a multidrug-resistant human lung Cancer cell line Science 258, 1650-1654
- 37 - Cole, S P C , Sparks, K E , Fraser, *et al* (1994) Pharmacological characterization of the multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells Cancer Res, 54, 5902-5910
- 38 - Cordon-Cardo, C , O'Brien, P , Boccia, J , Casals, D , Bertino, J R and Melamed, M R (1990) Expression of the multidrug- resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues J Histochem Cytochem, 38, 1277
- 39 - Chan, H S L , Thorner, P S , Haddad G , *et al* (1990) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood J Clin Oncol, 8, 689-704
- 40 - Chan, H S L , Haddad, G , Thorner, *et al* (1991) P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma N Engl J Med, 325 23, 1608-1614
- 41 - Chatterjee, M and Harris, A L (1990) Reversal of acquired resistance to adriamycin in CHO cells by tamoxifen and 4-hydroxy tamoxifen role of drug interaction with alpha 1 acid Br J Cancer, 62 5, 712-717
- 42 - Chaudary, P M and Roninson, I B (1991) Expression and activity of P-glycoprotein a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells Cell, 66 1, 85-94
- 43 - Chaudhary, P M , Mechetner, E B and Roninson, I B (1992) Expression and activity of the multidrug-resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes Blood, 80 11, 2735-2739

- 44 - Chin-Yee, I, Crowther, M A, Keeney, M, Wright, L and Daly, S (1994) Validation of a single point flow cytometric assay for determining P-glycoprotein activity in multidrug resistant cell lines *Clin lab Haemat*, 16, 261-272
- 45 - Chin-Yee, I, Alshammari, S, Anderson, L, Kadri, M and Keeney, M (1996) Comparison of two methods to detect P-glycoprotein in patients with chronic lymphocytic leukaemia *Clin Lab Haem*, 18, 99-104
- 46 - Dalton, W S, Grogan, T M, Meltzer, *et al* (1989a) Drug-resistance in múltiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy *J Clin Oncol*, 7, 415-424
- 47 - Dalton, W S, Grogan, T M, Rybski, J A, *et al* (1989b) Immunohistochemical detection and quantitation of P-glycoprotein in múltiple drug-resistant human myeloma cells association with level of drug resistance and drug accumulation *Blood*, 73 3, 747-752
- 48 - Dalton, W S, Crowley, J J, Salmon, S S, *et al* (1995) A Phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma A Southwest Oncology Group study *Cancer*, 75 38, 15-20
- 49 - Dano, K (1973) Active outward transport of daunomycin in Ehrlich ascites tumor cells *Biochim Biophys Acta*, 323, 466-483
- 50 - Dantzig, A H, Shepard, R J-, Cao, J, *et al* (1996) Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979 *Cancer Res*, 56, 4171-4179
- 51 - Darling, D C and Morgan, S J (1994) Animal cells Culture and media Serie editors D Rickwood and B D Homes John Wiley and sons
- 52 - Drach, D, Zhao, S, Drach, J *et al* (1992) Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistance gene *Blood*, 80, 2729-2734
- 53 - Desai, P B, Bhardwaj, R and Damle, B (1995) Effect of tamoxifen on mitoxantrone in drug-sensitive and multidrug-resistant MCF-7 cells *Cancer Chemother Pharmacol*, 36, 368-372
- 54 - Desoize, B, Broglio, C, Gorisse, *et al* (1994) Characteristics of four friend leukemia cell sublines resistant to adriamycin *AntiCancer Res*, 14, 995-1000
- 55 - De Lange, J H M, Schipper, N W, Schuurhuis, G J, *et al* (1992) Quantification by laser scan microscopy of intracellular doxorubicin distribution *Cytometry*, 13, 571-576
- 56 - De Vita, V T (1989) Jr Principles of chemotherapy Principles and practise of Oncology Edited by De Vita, V T, Hellman, S, Rosenberg, S A Philadelphia, JB Lipicott Company, 276-300
- 57 - Efferth, T, Lohrke, H and Volm, M (1989) Reciprocal correlation between expression of P-glycoprotein and accumulation of rhodamine 123 in human tumors *AntiCancer Res*, 9, 1633-1638
- 58 - Ehrlich, P H, Moustafa, Z A, Archinal-Mattheis, A E, Newman, M J, Bair, K W and Cohen, D O (1997) The reversal of multidrug resistance in multicellular tumor spheroids by SDZ PSC 833 *AntiCancer Res*, 17 1 A, 129-133
- 59 - Endicott, J A and Ling, V (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *Annu Rev Biochem*, 58, 137-171

- 60.- Epstein, J., Xiao, H., and Oba, B.K. (1989) P-glycoprotein expression in plasma-cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood*, 74:3, 913-917.
- 61.- Feller, N., Kuiper, C.M., Lankelma, *et al* (1995) Functional detection of *MDR1/P170* and *MRP/P190*-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. *Brit J Cancer*, 72, 543-549.
- 62.- Fenneteau, O., Marie, J.P., Lescoeur, B., Vilmer, E. and Schlegel, N. (1993) Expression of the multidrug resistance associated P-glycoprotein (P-170) in acute lymphoblastic leukemia (letter) *Blood*, 82:12, 3787-3789.
- 63.- Ferrand, V.L., Montero Julian, F.A., Chauvet, M.M., Hirn, M.H. and Bourdeaux, M.J. (1996) Quantitative determination of the MDR-related P-glycoprotein, P-gp 170, by a rapid flow cytometric technique. *Cytometry*, 23, 120-125.
- 64.- Fisher GA, Hausdorff J, Lum BL, *et al*. Phase I trial of etoposide with the cyclosporine SDZ PSC 833, a modulator of multidrug resistance (MDR). *Proc Am Soc Clin Oncol* 13: 143-, 1994.
- 65.- Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., *et al*. (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumor and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 265-269.
- 66.- Frey, T., Yue, S. and Haugland, R.P. (1995) Dyes providing increased sensitivity in flow-cytometric dye-efflux assays for multidrug resistance. *Cytometry*, 20, 218-227.
- 67.- García del Moral, R., O'Valle, F., Andujar, M *et al* (1995) Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistochemical and cell culture study. *Am J Pathol*, 146:2, 398-408.
- 68.- Gaveriaux, C., Boesch, D., Jachez, B., *et al*. (1991) SDZ PSC 833, a non-immunosuppressive cyclosporin analog, is a very potent multidrug-resistance modifier. *J Cell Pharmacol*, 2, 225-234.
- 69.- Germann, U.A., Chambers, T.C., Ambdukar, S.V., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1995) Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr*, 27:1, 53-61.
- 70.- Gheuens, E.E., van Bockstaele, D.R., van de Keur, M., Tanke, J., van Oosterom, A.T. and De Bruijn, E.A. (1991) Flow cytometric double labeling technique for screening of multidrug resistance. *Cytometry*, 12, 636-44.
- 71.- Giaccone, G., Linn, S.C., Catime, G., *et al*. (1994). SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin: a phase I and pharmacologic study in solid tumors. *AntiCancer Drugs*, 5, suppl 1. 42.
- 72.- Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C., Valverde, C.F., Mintening, G.M. and Sepúlveda, F.V. (1992) Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, 71, 23-32.
- 73.- Goasguen, J.E., Dossot, J.M., Fardel, *et al* (1993) Expression of the multidrug resistance associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia. Prognostic implications. *Blood*, 81:9, 2394-2398.
- 74.- Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, *et al* (1989) Expression of a multidrug resistance gene in human Cancers. *J. Natl Cancer Inst*, 81:2, 116-124.
- 75.- Goldstein, L.J., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1992) Multidrug resistance in human Cancer (Review). *Crit Rev Oncol Hemat*, 12, 243-253.

- 76 - Gomez-Arbonés, X Citometría de flujo (1990) En Beca I E I Beca de colaboración amb la secció de Medicina Institut d'Estudis Ilerdencs, Lleida
- 77 - Grant, C E , Valdimarson, G , Hipfner, D R , Almquist, K C , Cole, S P and Deeley, R G (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs *Cancer Res*, 54, 357-361
- 78 - Grogan, T , Dalton, W , Rybski, *et al* (1990) Optimization of immunocytochemical P-glycoprotein assesment in multidrug-resistant plasma cell myeloma using three antibodies *Lab Invest*, 63 6, 815-824
- 79 - Grogan, T M , Spier, C M , Salmon,*et al* (1993) P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma correlation with prior chemotherapy *Blood*, 81 2, 490-495
- 80 - Grulois, I , Fardel, O , Drenou, B , *et al* (1995) Multidrug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia *Acta Haematol*, 94 2, 78-83
- 81 - Gruol, D J , Zee, M C , Trotter, J and Burgeois, S (1994) Reversal of multidrug resistance by RU 486 *Cancer Res*, 54, 3088-3091
- 82 - Gupta, S and Gollapudi, S (1993) P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system Its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection *J Clin Immunol*, 13, 289-301
- 83 - Hama, S , Kurisu, K and Saijo, N (1997) Cyclosporine as drug resistance modifiers, mechanism and clinical investigation *Nippon Rinsho*, 55 5, 1103-1110
- 84 - Hamada, H and Tsuruo, T (1986) Functional role for the 170-to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies *Proceedings of the National Academy of Science*, 83, 7785-7789
- 85 - Hart, S M , Ganeshaguru, K , Scheper, R J , *et al* (1995) Expression of the human major vault protein in haematological malignancies *Am Soc Haematol*, (Abstract)
- 86 - Hegewisch-Becker, S , Haanania, E G , FU, S , Korbling, M , Deisseroth, A B and Andreef, M (1995) Transduction of *MDR1* into human and mouse haematopoietic progenitors cells use of rhodamine (Rh123) to determine transduction frequency and in vivo selection *Brit J Haematol*, 90, 876-883
- 87 - Hegewisch-Becker, S , Faltz, C and Hossfeld, D K (1996) Prolongation of medium exchange is associated with a decrease in function but not expression of the P-glycoprotein pump in leukaemic cells *Eur J Haematol*, 56, 12-22
- 88 - Herweijer, H , Van den Engh, G and Nooter, K (1989) A rapid and sensitive flow cytometric method for the detection of multidrug-resistant cells *Cytometry*, 10, 463-468
- 89 - Herweijer, H , Sonnenveld, P , Baas, F , *et al* (1990) Expression of *mdr1* and *mdr3* multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and asociation with stimulation of accumulation by ciclosporine *J Natl Cancer Inst* 82, 1133-1140
- 90 - Higgins, C F (1992) ABC transporters From microorganisms to man *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113
- 91 - Hindenburg, A A , Gervasoni, J E , Khrisna, S , *et al* (1989) Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracyclin-sensitive and -resistant HL-60 cells *Cancer Res*, 49, 4607-4614

- 92 - Holmes, J, Jacobs, A, Carter, G, *et al* (1989) Multidrug resistance in hematopoietic cell lines, myelodysplastic syndromes and acute myeloblastic leukemia *Br J Hematol*, 72, 40-44
- 93 - Hu, X F, Martin, T J, Bell, D R, *et al* (1990) Combined use of cyclosporin A and verapamil in modulating multidrug resistance in human leukemia cell lines *Cancer Res*, 50, 2953-2957
- 94 - Ito, Y, Tanimoti, M, Kumazawa, T, *et al* (1989) Increased P-glycoprotein expression and multidrug-resistant gene (*mdr1*) amplification are infrequently found in fresh acute leukemia cells *Cancer*, 63, 1534-1538
- 95 - Izquierdo, M A, van der Zee, A G J, Vermorker, J B, *et al* (1995) Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma *J Natl Cancer Inst*, 87, 1230-1237
- 96 - Jachez, B, Nordmann, R and Loo, F (1993) Restoration of taxol sensitivity of multidrug-resistant cells by the cyclosporine SDZ PSC 833 and the cyclopeptide SDZ 280-446 *J Natl Cancer Inst*, 85, 478-483
- 97 - Jiang, X R, Kelsey, S M, Wu, Y L and Newland, A C (1995) Circumvention of P-glycoprotein-mediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC 833 *Brit J Haematol*, 90, 375-383
- 98 - Jonsson, B, Nilsson, K, Nygren, P and Larsson, R (1992) SDZ PSC 833 a novel potent *in vitro* chemosensitizer in múltiple myeloma *Anti-Cancer Drug*, 3 6, 641-646
- 99 - Juliano, R L and Ling, V (1976) A Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster avary cell mutants *Biochim Biophys Acta*, 455, 152-162
- 100 - Kajiji, S, Dreslin, J A, Grizzuti, K, Gros, P (1994) Structurally distinct MDR modulators show specific patterns of reversal against P-glycoproteins bearing unique mutations at serine *Biochemistry*, 33, 5041-5048
- 101 - Kanamaru, H, Kakahi, Y, Yashida, O, *et al* (1989) *MDR1* mRNA levels in human renal cell carcinoma correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor extracts *J Natl Cancer Inst*, 81,844,
- 102 - Kartner, N, Everden-Porelle, D, Bradley, G and Ling, V (1985) Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies *Nature*, 316, 820-823
- 103 - Kedersha, N L and Rome, L H (1986) Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle large structures contain a single species of small RNA *J Cell Biol*, 103, 699-709
- 104 - Keller, R P, Altermatt, H J, Zihlmann, H, Laissue, J A and Hiestand, P C (1992) Pharmacologic interactions between the resistance-modifying cyclosporine SDZ PSC 833 and etoposide (VP 16-213) enhance *in vivo* cytostatic activity and toxicity *Int J Cancer*, 51 3, 433-438
- 105 - Kessel, D and Wilberding, C (1985) Promotion of daunorubicin uptake and toxicity by the calcium antagonist triapamil and its analogs *Cancer Treat Rev*, 69, 673-676
- 106 - Kim, J H, Chung, J B, Park, *et al* (1993) Combined use of Tamoxifen, cyclosporin A, and verapamil for modulating multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cell lines *Yonsei Med J*, 34, 35-44

- 107 - Klumper, E , De Boer, M L., Pieters, R , *et al* (1995) Non-P-glycoprotein mediated resistance to anthracyclines is associated with the expression of a 110 kD protein in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia In Klumper E ed Thesis Drug Resistance and Relapsed Leukemia Amsterdam, VU, University Press 117-130
- 108 - Koizum, S , Konishi, M , Ichihara, *et al* (1995) Flow cytometric functional analysis of multidrug resistance by Fluo-3 a comparison with rhodamine-123 Eur J Cancer, 31 A 10, 1682-1688
- 109 - Kohler, G and Milstein, C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity Nature, 256, 495-497
- 110 - Kornblau, S M , Estey, E , Madden,*et al* (1997) Phase I study of mitoxantrone plus etoposide with multidrug blockade by SDZ PSC 833 in relapsed or refractory acute myelogenous leukemia J Clin Oncol, 15 5, 1796-1802
- 111 - Kuwazuru, Y , Yoshimura, A , Hamada, S , *et al* (1990) Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance Cancer, 66, 868-873
- 112 - Lai, S L , Goldstein, L J , Gottesman, M M , *et al* (1989) *MDR1* gene expression in lung Cancer J Natl Cancer I, 81, 1144-1150
- 113 - Lampidis, T J , Munck, J N , Krishan, A , *et al* (1985) Reversal of resistance to rhodamine in adriamycin-resistant friend leukemia cells Cancer Res, 45, 2626-2631
- 114 - Lautier, D , Canitrot, Y and Salmon, J M (1994) Effects of Vinblastine, Colchicine, and Verapamil on Rhodamine 123 accumulation in human P-glycoprotein-positive leukemia cells AntiCancer Res, 14, 2589-2596
- 115 - Leith, C P , Chen, IM , Kopecky, J , *et al* (1995) Correlation of multidrug resistance (*MDR1*) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry Identification of discordant *MDR1*⁻/efflux⁺ and *MDR1*⁺/efflux⁻ cases Blood, 86 6, 2329-2342
- 116 - Lehnert, M , Dalton, W S , Roe, D , Emerson, S and Salmon, S E (1991) Synergistic inhibition by verapamil and quinine of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human myeloma cell line model Blood, 77 2, 348-354
- 117 - Lehnert, M (1996a) Clinical multidrug resistance in Cancer a multifactorial problem Eur J Cancer, 32 6, 912-920
- 118 - Lehnert, M , De Giuli, R , Kunke, K , Emerson, S , Dalton W S and Salmon, S E (1996b) Serum can inhibit reversal of multidrug resistance by chemosensitizers Eur J Cancer, 32A 5, 862-867
- 119 - Leighton, J C and Goldstein, L J (1995) P-glycoprotein in adult solid tumors Expression and prognostic significance Hematology and Oncology Clinics of North America, 9 2, 251-273
- 120 - Leonessa, F , Jacobson, M , Boyle, B , *et al* (1994) Effect of tamoxifen on the multidrug-resistant phenotype in human breast Cancer cells Isobologram, drug accumulation and M_r 170,000 glycoprotein binding studies Cancer Res, 54, 441-447
- 121 - Licht, T , Pastan, I , Gottesman, M and Herrmann, F (1994) P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in normal and neoplastic hematopoietic cells Ann Hematol, 69 4, 159-171

- 122 - Linsenmeyer, M E , Jefferson, S , Wolf, M , *et al* (1992) Levels of expression of the *mdr1* gene and glutathione S transferase genes 2 and 3 and response to chemotherapy in múltiple myeloma Br J Cancer, 65, 471-475
- 123 - List, A F (1996) Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia Leukemia, 10 6, 937-942
- 124 - Ludescher, C , Gatringer, C , Drach, J and Grunicke, H (1991) Rapid functional assay for the detection of multidrug-resistant cells using the fluorescent dye rhodamine 123 (Letter) Blood, 78, 1385-1390
- 125 - Ludescher, C , Thaler, J , Drach, D , *et al* (1992) Detection of activity of P-glycoprotein in human tumour samples using rhodamine 123 Brit J Haematol, 82, 161-168
- 126 - Ludescher, C , Hilbe, W , Eisterer, W , *et al* (1993) Activity of P-glycoprotein in B-cell chronic lymphocytic leukemia determined by a flow cytometric assay J Natl Cancer Inst, 85, 1751-1758
- 127 - Ludescher, C , Eisterer, W , Hilbe, W , Hoffmann J and Thaler, J (1995) Decreased potency of MDR-modulators under serum conditions determined by a functional assay Brit J Haematol, 91, 652-657
- 128 - Lum, B L and Gosland, M P (1995) MDR expression in normal tissues Pharmacologic implications for the clinical use of P-Glycoprotein inhibitors Hematology and Oncology Clinics of North America, 9 2, 319-335
- 129 - Lyubimov, E , Lan, L B , Pashinsky, I , Ayesh, S and Stein W D (1995) Saturation reversal of the multidrug pump using many reverses in low-dose combinations Anti-Cancer Drug 6 6, 727-735
- 130 - Marie, J P , Zittoun, R and Sikic, B I (1991) Multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in adult acute leukemia Correlation with treatment outcome and in vitro drug sensitivity Blood, 78 3, 586-592
- 131 - Marie, J P , Delmer, A and Zittoun, R (1994) *Mdr1* expression in B and T lymphocytes in B-cell lymphoproliferative disorders Proc Am Assoc Cancer Res, 10,11
- 132 - Marie, J P (1995) P-glycoprotein in adult hematologic malignancies Hematology and Oncology Clinics of North America, 9 2, 239-249
- 133 - Marks, C D , Su, G M I , Davey, R A *et al* (1996) Extended multidrug resistance in haemopoietic cells Brit J Haematol, 95, 587-595
- 134 - Mattern, J and Volm, M (1993) Múltiple pathway drug resistance (Review) Int J Oncol 2, 557
- 135 - Melamed, M R , Mullaney, P F , Shapiro, H M (1991) An historical review of the development of flow cytometers and sorters En flow cytometry and sorting Editores Melamed, M R , Lindmo, T, Mendelsohn, M L Wiley-Liss
- 136 - Michieli, M , Raspadori, D , Damiani, D , *et al* (1991) The expression of the multidrug resistance-associated glycoprotein in B-cell chronic lymphocytic leukaemia Brit J Haematol, 77, 460- 465
- 137 - Michieli, M , Damiani, D , Michelutti, A , *et al* (1994) Restoring uptake and retention of daunorubicin and idarubicin in P170-related multidrug resistance cells by low

- concentration D-verapamil, cyclosporin-A and SDZ PSC 833 *Haematologica*, 79 6, 500-507
- 138 - Mickisch, G H , Pai, L H , Gottesman, M M and Pastan, I (1992) Monoclonal antibody MRK16 reverses the multidrug resistance of multidrug-resistant transgenic mice *Cancer Res*, 52, 4427-4432
- 139 - Miller, T P , Grogan, T M , Dalton, W S , Spier, C M , Scheper, R J and Salmon, S E (1991) P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil *J Clin Oncol* 9 1, 17-24
- 140 - Miller, T P , Grogan, T M , Dalton, W S , Spier, C M , Scheper, R J and Salmon S E (1991) P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil *J Clin Oncol*, 9, 17-24
- 141 - Millward, M J , Cantwell, B M , Lien, E A , Carmichael, J and Harris, A L (1992) Intermittent high-dose tamoxifen as a potential modifier of multidrug resistance *Eur J Cancer*, 28A ,805-810
- 142 - Naito, M , Watanabe, T , Tsuge, H , Koyama, T , Oh-hara, T and Tsuruo, T (1996) Potentiation of the reversal activity of SDZ PSC 833 on multi-drug resistance by an anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK-16 *Int J Cancer*, 67 3, 435-440
- 143 - Niehans, G A , Jaszcz, W , Brunetto, V , *et al* (1992) Immunohistochemical identification of P-glycoprotein in previously untreated, diffuse large cell and immunoblastic lymphomas *Cancer Res*, 52, 3768-3775
- 144 - Nielsen, D and Skovsgaard, P (1992) P-glycoprotein as multidrug transporter a critical review of current multidrug resistant cell lines (review) *Biochim Biophys Acta*, 1139-1169
- 145 - Noonan, K E , Beck, C , Holzmayer, T A , Chin, J E , Wunder, J S , Andrusis, I L , Gazdar, A F , Willman, C L , Griffith, B , Von Hoff, D D , *et al* (1990) Quantitative analysis of *MDR1* gene expression in human tumors by polymerase chain reaction *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 18, 7160-7164
- 146 - Nooter, K , Sonnenveld, P , Janssen, A , *et al* (1990) Expression of the *MDR3* gene in polymorphocytic leukemia association with cyclosporin-A-induced increase in drug accumulation *Int J Cancer*, 45, 626-631
- 147 - Nooter, K and Herweijer, H (1991a) Multidrug resistance (*mdr*) genes in human Cancers *Brit J Cancer*, 63, 663-669
- 148 - Nooter, K , Sonnenveld, P , Oostrum, R , Herweijer, H , Hagenbeek, T and Valerio, D (1991b) Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by ciclosporin A *Int J Cancer*, 45 2, 263- 268
- 149 - Paietta, E , Andersen, J , Racevskis, M , Ashigbi, M , Cassileth, P , Wiernik, P H and the Eastern Cooperative Oncology Group (1995) Modulation of multidrug resistance in de novo adult acute myeloid leukemia Variable efficacy of reverting agents in vitro *Blood Rev*, 9, 47-52
- 150 - Pasman, P C and Schouten, H C (1993) Multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in haematological malignancies, *Neth J Med*, 42, 218-231

- 151 - Pastan, I and Gottesman, M (1987) Múltiple-drug resistance in human Cancer New Engl J Med, 316 22, 1388-1393
- 152 - Pérez Simón, J A , Valverde, B E , Martínez, A , *et al* (1995) Multirresistencia a drogas (MDR) en mieloma múltiple Comunicación oral 458 XXXVII Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia ,
- 153 - Pétriz, J , O'Connor, J E , García Lopez, J (1995) Rhodamine 123 efflux in drug resistance assays (Letter) Leukemia, 10, 748-749
- 154 - Pétriz, J and García-Lopez, J Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123 Leukemia 1997, 11-16
- 155 - Pinedo, H M and Giaccone, G (1995) P-glycoprotein- A marker of Cancer-cell behavior New Engl J Med, 33 21, 1417-1419
- 156 - Pirker, R , Goldstein, L J , Ludwig, H , *et al* (1989) Expression of a multidrug resistance gene in blast crisis of chronic myelogenous leukemia Cancer Co, 1 2, 141-144
- 157 - Pirker, R , Wallner, J , Geissler, K , *et al* (1991) *MDR1* gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia J Natl Cancer Inst, 83 10, 708-712
- 158 - Pourtier-Manzanedo, A , Didier, A D , Muller, C D and Loo, F (1992) SDZ PSC 833 and SDZ 280-446 are the most active of various resistance-modifying agents in restoring rhodamine-123 retention within multidrug resistant P388 cells Anti-Cancer Drug, 3 4, 419-425
- 159 - Ramu, A , Glaubiger, D and Fuks, Z (1984) Reversal of acquired resistance to doxorubicin in P388 murine leukemia cells by tamoxifen and other tripanarol analogues Cancer Res, 44, 4392-4395
- 160 - Rao, U S , Fine, R L and Scarborough, G A (1994) Antiestrogens and steroids hormones substrates of the human P-glycoprotein Biochem Pharmacol, 48 2, 287-292
- 161 - Robert, J (1994) Structure and function of P-glycoprotein Bull Cancer (Paris) 81 5, 400-408
- 162 - Roninson, I B (1987) Molecular mechanism of multidrug resistance in tumor cells Clin Physiol Biochem, 5, 140-151
- 163 - Ross, D D , Wooten, P J , Sridhara, R , Ordoñez, J V , Lee, E J and Schiffer, C A (1993) Enhancement of daunorubicin accumulation, retention and cytotoxicity by verapamil or cyclosporin A in blast cells from patients with previously untreated acute myeloid leukemia Blood, 82, 1288-1299
- 164 - Russo, D , Marie, J P , Zhou, D C , *et al* (1994) Overexpression of anionic glutathione-S-transferase and multidrug resistance genes in acute myeloid and lymphoid leukemias Leukemia, 8 5, 881-884
- 165 - Sardini, A , Mintening, G M , Valverde, M A , Sepúlveda, F V , Gill, D R , Higgins, C F and McNaughton, P A (1994) Drug efflux mediated by the human multidrug resistance P-glycoprotein is inhibited by cell swelling J Cell Sci, 107, 3281-3290
- 166 - Scotto, K W , Biedler, J L and Melera, P W (1986) Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells Science, 232, 751-755

- 167 - Scheffer, G L , Wijngaard, P L J , Flens, M J , *et al* (1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein *Nature Med*, 1 6, 578-582
- 168 - Scheper, R J , Broxterman, H J , Scheffer, G L , *et al* (1993) Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *Cancer Res*, 53, 1475-1479
- 169 - Schuurhuis, C M , Scheffer, G L , Scheper, R J , *et al* (1991) Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein *Brit J Cancer*, 64, 857-861
- 170 - Shao, Y M , Ayesh, S , and Stein, W D (1997) Mutually co-operative interactions between modulators of P-glycoprotein *Biochim Biophys Acta*, 1360 1, 30-38
- 171 - Shapiro, H M *Practical flow cytometry* Alan R Liss, Inc , New York, 1988
- 172 - Shen, D-w, Fojo, A , Chin, J E , *et al* (1986) Human multidrug-resistant cell lines increased *mdr1* expression can precede gene amplification *Science*, 232, 643-645
- 173 - Shi, T , Wrin, J , Reeder, J , *et al* (1995) High-affinity monoclonal antibodies against P-glycoprotein *Clinical Immunol Immunop*, 76 1, 44-51
- 174 - Shin, H J , Lee, J S , Hong, W K , *et al* (1992) Study of multidrug resistance (*mdr1*) gene in non-small-cell lung carcinoma *AntiCancer Res*, 1, 367-370
- 175 - Shustik, C , Groulx, N and Gros, P (1991) Analysis of multidrug resistance (*MDR1*) gene expression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) *Brit J Haematol* 79 50-56
- 176 - Sonnenveld, P , Durie, B G M , Lokhorst, H M , *et al* (1993) Analysis of multidrug resistance (*mdr1*) glycoprotein and CD56 expression to separate monoclonal gammopathy from múltiple myeloma *Brit J Haematol*, 83, 63
- 177 - Sonnenveld, P , Marie, J P , Huisman, C , *et al* (1996) Reversal of multidrug resistance by SDZ PSC 833, combined with VAD (vincristine, doxorubicin, dexamethasone) in refractory múltiple myeloma A phase I study *Leukemia*, 10 11, 1741-1750
- 178 - Spoelstra, E C , Westerhoff, H V , Pinedo, H M , Dekker, H And Lankelma, J (1994) The multidrug-resistance-reverser verapamil interferes with cellular P-glycoprotein-mediated pumping of daunorubicin as a non-competing substrate *Eur J Biochem* , 221, 363-373
- 179 - Steen, H B *Characteristics of flow cytometers* (1991) *En Flow Cytometry and Sorting* Editores Melamed, MR , Lindmo, T , Mendelsoh, M L Wiley-Liss
- 180 - Stuart, N S , Philip, P , Harris, A L , *et al* (1992) High-dose tamoxifen as an enhancer of etoposide cytotoxicity Clinical effects and in vitro assessment in P-glycoprotein expressing cell lines *Brit J Cancer*, 66, 833-839
- 181 - Tiberghien, F, and Loor, F (1996) Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay *Anti-Cancer Drug*, 7 5, 568-578
- 182 - Thiebaut, F , Tsuruo, T , Hamada, H , *et al* (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal tissues *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 7735-7738
- 183 - Thiebaut, F , Tsuruo, T , Hamada, H , *et al* (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein p170 evidence

- for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem*, 37, 159-164.
- 184.- Toffoli, G., Simone, F., Corona, G., *et al* (1995) Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol*, 50 :8, 1245-1255.
- 185.- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., *et al*. (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*, 41, 1976-1972.
- 186.- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. (1982) Increased accumulation of vincristine and Adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res*, 42, 4730-4733.
- 187.- Tsuruo, T. and Tomida, A. (1995) Multidrug Resistance. *Anti-Cancer Drug*, 6:2, 213-218.
- 188.- Twentyman, P.R., Fox, N.E. and White, D.J.G. (1987) Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer line. Short communication. *Br J Cancer*, 56, 55-57.
- 189.- Twentyman, P.R. and Bleehen, N.M. (1991) Resistance modification by PSC 833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin A. *Eur J Cancer*, 27, 1639-1642.
- 190.- Twentyman, P.R. (1995) Modifiers of multidrug resistance. Annotation. *Brit J Haematol*, 90, 735-737.
- 191.- Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., *et al* (1986) The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Co*, 141, 956-962.
- 192.- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1987) Expression of a full-length cDNA for the human *mdr1* (P-glycoprotein) gene confers multidrug-resistance in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 3004-3008.
- 193.- Van Acker, K.L., Van Hove, L.M. and Boogaerts, M.A. (1993) Evaluation of flow cytometry for multidrug resistance detection in low resistance K562 cells using daunorubicin and monoclonal antibodies. *Cytometry*, 14, 736-746.
- 194.- Van der Graaf, W.T.A., de Vries, E.G.E., Timmer-Bosscha, H., *et al*. (1994). Effects of amiodarone, cyclosporin A, and PSC 833 on the cytotoxicity of mitoxantrone, doxorubicin, and vincristine in non-P-glycoprotein human small lung Cancer cell lines. *Cancer Res*, 54, 5368-5373.
- 195.- Webb, M., Raphael, C.L., Asbahr, H., Erber, W.N. and Meyer, B.F. (1996). The detection of rhodamine 123 efflux at low levels of drug resistance. *Brit J Haematol*, 93, 650-655.
- 196.- Willingham, M.C., Cornwell, M.M., Cardarelli, C.O., *et al*. (1986) Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and sensitive KB cells: Effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res*, 46, 5941-5946.
- 197.- Xu, D., Knaust, E., Pisa, P., *et al*. (1996) Levels of *mdr1* and *mrp* mRNA in leukaemic populations from patients with acute myelocytic leukaemia are heterogenous and inversely correlated to cellular daunorubicin accumulation. *Brit J Haematol*, 92, 847-854.

- 198.- Young, P. and Kransey, P. (1992) Stimulation of interleukin 1 β secretion in monkey kidney cells by coexpression of the mammalian P-glycoprotein MDR 1. In Ghezzi P, Mantovani A (eds): Pathophysiology and Pharmacology of cytokines. Boca ratón ,FL, Biomedical Press, 21-27.
- 199.- Zaman, G.J.R., Flens, M.J, Vanleusden, M.R., *et al.* (1994) The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. Proc Natl Acad Sci USA, 91, 8822-8826.
- 200.- Zhou, D.C., Marie, J.P., Suberville, A.M. and Zittoun, R. (1992) Relevance of *mdr1* gene expression in acute myeloid leukemia and comparison of different diagnosis methods. Leukemia, 6:9, 879-885.

ANEXOS

XI.- ANEXOS

Anexo 1

Anexo 1: Test utilizado para realizar la calibración de la alineación del citómetro de flujo.

| | Parámetros | Discriminador | Ganancia |
|--|---|---------------|------------------------|
| Volumen de muestra: 180 μ l Velocidad inyección: 10 μ l/min Presión fluido: 7.40 psi 488 nm 15 mW | FW SS: 400 V FL1: 810 V FL2: 810 V FL3: 0 V FL2 – 10 % FL1 | 200 | 5 7.5 Log Log |

Anexo 2

Anexo 2: Test utilizado para realizar los estudios de cinética de incorporación y expulsión con DNR

| | Parámetros | Discriminador | Ganancia |
|---|---|---------------|----------------------------|
| Volumen de muestra: 50 μ l Velocidad inyección: 50 μ l/min Presión fluido: 7.40 psi 488 nm 15 mW | FW SS: 400 V FL1: 0 V FL2: 750 V FL3: 750 V | 150 | 1 3 Log Log 20 |

Anexo 3

Anexo 3: Primera parte del test utilizado para la valoración de la viabilidad celular

| | Parámetros | Discriminador | Ganancia |
|--|--|---------------|------------------------------------|
| Volumen de muestra: 190 μ l Velocidad inyección: 30 μ l/min Presión fluido: 7.40 psi 488 nm 15 mW | FW SS: 400 V FL1: 0 V FL2: 0 V FL3: 720 V FL3 pico: 720 V | 50 | Log Log Log Log 1 1 |

Anexo 4

Anexo 4: Segunda parte del test utilizado para la valoración de la viabilidad celular

| | Parámetros | Discriminador | Ganancia |
|--|--|---------------|------------------------------------|
| Volumen de muestra: 190 μ l Velocidad inyección: 30 μ l/min Presión fluido: 7.40 psi 488 nm 15 mW | FW SS: 400 V FL1: 0 V FL2: 0 V FL3: 720 V FL3 pico: 720 V | 50 | Log Log Log Log 1 1 |

Anexo 5

Anexo 5: Test utilizado para realizar el conteo celular exacto

| | Parámetros | Discriminador | Ganancia |
|--|------------|---------------|----------|
| Volumen de muestra: 100 µl Velocidad inyección: 40 µl/min Presión fluido: 7.40 psi 488 nm 15 mW | FW | 50 | 1 |
| | SS: 400 V | 50 | 5 |
| | FL1: 800 V | | Log |
| | FL2: 0 V | | Log |
| | FL3: 0 V | | 20 |

Anexo 6

Anexo 6: Test utilizado para la valoración inmunofenotípica de P-gp 170 utilizando el anticuerpo monoclonal 4E3

| | Parámetros | Discriminador | Ganancia |
|---|----------------|---------------|----------|
| Volumen de muestra: 50 µl Velocidad inyección: 60 µl/min Presión fluido: 7.40 psi 488 nm 15 mW | FW | 175 | 1 |
| | SS: 400 V | | 3 |
| | FL1: 0 V | | Log |
| | FL2: 800 V | | Log |
| | FL3: 750 V | | Log |
| | FL2 – 85 % FL3 | | |



