

Expresión de Proteínas Relacionadas con Resistencia a Múltiples Drogas (MDR-Proteínas) y su implicación pronóstica en la supervivencia en el Cáncer de Pulmón

Multidrug Resistance Proteins (MDR-Proteins) expresión and prognostic value on survival in lung cancer

MDR-proteinaren espresioa eta duten garrantzia birrikako minbizi iraupenean

(1) Alfredo Paredes-Lario, (2) Carlos Blanco-García, (3) Miguel Echenique-Elizondo

(1) Servicio de Oncología. Hospital Donostia. Donostia-San Sebastián. Gipuzkoa. España UE.

(2) Servicio de Radioterapia. Hospital Donostia. Donostia-San Sebastián. Gipuzkoa. España UE.

(3) Departamento de Cirugía. Universidad del País Vasco. Bizkaia. España UE.

Resumen

Introducción. La reducción en la acumulación intracelular de los fármacos, es uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a los antineoplásicos. Las proteínas transportadoras de membrana juegan un papel esencial en éste fenómeno.

Material y Métodos. Se recogieron 147 muestras tumorales procedentes de 143 pacientes. De éstas, 35 eran broncoscópicas y 112 quirúrgicas. Resultaron válidas para el estudio 101 muestras correspondientes a 99 pacientes. Las muestras tumorales criocongeladas fueron sometidas a análisis inmunohistoquímico para la detección de las tres MDR-proteínas, Pgp, Mrp1 y Lrp

Resultados. No expresaban ninguna proteína, 16 casos. Expresaban una sola proteína, 32 casos: 3 Pgp, 11 Mrp1 y 18 Lrp=0. Expresaban dos proteínas, 34 casos: 24 Pgp y Lrp, 5 Mrp1 y Pgp, 5 Mrp1 y Lrp=0. Expresaban las tres proteínas, 17 casos. No hemos detectado relación significativa entre la edad y la expresión de Pgp ($p=0.74$), Mrp1 ($p=0.95$), o Lrp ($p=0.26$). No detectamos diferencias significativas entre sexos, tanto al analizar por el número ($p=0.72$), como por el tipo ($p=0.39$) de proteínas expresadas de forma simultánea. Tampoco detectamos diferencias significativas entre los diferentes estadios tumorales, tanto para el número ($p=0.55$), como para el tipo ($p=0.21$) de MDR-proteínas expresada. Tampoco detectamos diferencias significativas entre los diferentes grados histológicos, tanto para el número ($p=0.59$), como para el tipo ($p=0.51$) de MDR-proteínas expresadas simultáneamente esadas simultáneamente. La tendencia de Pgp y Lrp a expresarse asociadas ha resultado muy significativa ($p<0.01$), no ocurrió lo mismo para la sociación Pgp y Mrp1 ($p=0.18$) o Mrp1 y Lrp ($p=0.26$).

Conclusiones. El cáncer de pulmón expresa con frecuencia MDR-proteínas. De las tres MDR-proteínas estudiadas, Pgp Mrp1 y Lrp, es Lrp la más frecuentemente expresada. Los adenocarcinomas expresan menos Mrp1 que el resto de los tipos histológicos. Los carcinomas escamosos expresan menos Lrp que los adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de célula grande. Una proporción importante de pacientes expresan de forma simultánea más de una MDR-proteína. Los carcinomas escamosos, son los que con más frecuencia expresan Pgp, Mrp1 y Lrp de forma simultánea. Pgp se expresa fundamentalmente asociada a Lrp. No encontramos relación significativa en cuanto a la supervivencia y la expresión de Lrp ($p=0,41$), Mrp1 ($p=0,51$), Pgp ($p=0,21$) o cuando se expresan las tras asociadas ($p=0,56$).

Palabras clave: MDR-proteínas, Cáncer , Pulmón, Supervivencia

Correspondencia:

Miguel Echenique-Elizondo

Catedrático de Cirugía

Facultad de Medicina. UD San Sebastián

Universidad del País Vasco

P. Dr. Begiristain, 105.

20014. San Sebastián. Gipuzkoa. España UE.

Tfno. +34-943017319

Fax +34-9430017330

Correo electrónico: gepecelm@sc.ehu.es

Enviado: 09/09/05 Aceptado: 09/09/06

Summary

Background. Intracellular drug accumulation reduction plays an important role in resistance to chemotherapy in neoplasms. MDR-proteins regulate this cell activity.

Methods. 147 tumor samples were collected from 143 patients. 35 were done by bronchoscopy and 112 were surgical specimens. 101 samples from 99 patients were valid for the study. Cryopreservation and immunohistochemistry for detection of MDR-proteins: Pgp, Mrp1 y Lrp, was done by monoclonal murine Ab. **Results.** 16 cases did not express any protein. One protein was expressed in 32 cases: 3 Pgp, 11 Mrp1 and 18 Lrp=0. Two proteins were expressed in 34 cases: 24 Pgp and Lrp, 5 Mrp1 y Pgp, 5 Mrp1 y Lrp=0. 17 cases expressed all three proteins, 17 cases. No differences were observed in this expression according to age: Pgp ($p=0.74$), Mrp1 ($p=0.95$), Lrp ($p=0.26$), sex: numerical ($p=0.72$), type ($p=0.39$) of simultaneously expressed proteins. Neither differences were observed according to tumor: numerical ($p=0.55$), type ($p=0.21$) and pathology grade: both numerical ($p=0.59$) or type considered ($p=0.51$). Tendency of simultaneous expression of Pgp and Lrp has been very significant ($p<0.01$). The same was not observed in the association between Mrp1 and Lrp ($p=0.26$).

Conclusions. Lung cancer frequently express MDR-proteins. Lrp is the most frequent. Adenocarcinoma express less Mrp1 than the rest of pathology classes. Squamous carcinoma express less Lrp than adenocarcinoma and large-cell undifferentiated carcinomas. More than two proteins are expressed simultaneously in significant number of cases. Squamous-cell carcinomas tend to express Pgp, Mrp1 and Lrp simultaneously. Pgp is expressed usually associated to Lrp. No differences in survival and MDR-proteins expression has been found when considered Lrp ($p=0.41$), Mrp1 ($p=0.51$), Pgp ($p=0.21$) and even when proteins expressed simultaneously ($p=0.56$).
Key Words: MDR-proteins, Lung, Cancer, Survival

Laburpena.

Sarrera. Zelularen barruan neoplasia aurkako botikaren kontzentrazio murrizpena garrantzi handia du erresistentzia zortzen duten erabiltzen diren bide artean. Zelula azaleko garraio proteinak zerikusi handia dute honen barru

Materiala eta Metodoak. 147 birikako tumore mostrak jasoak izan ziren 143 gaixoetik. Hoenetik 35 bronkoskopia bidez egindakoak izan ziren eta 112 zirujariaren bidez egindakoak. 101 mostrak – 99 gaixoetakoak - baliogarriak izan ziren ikerketa aurrera eramateko. Krio-hoztatutako mostrak immuno-histokimiko prozeduraren bidez ikertuak izan ziren hiru MDR-proteinaren - Pgp, Mrp1 eta Lrp – azalgarritasuna ikusia izana erakusteko. **Emaitzak.** 16 kasutan ez zen agertzen proteina bat ere. Proteina bakarra azaltzen zen 32 kasuetan : 3 Pgp, 11 Mrp1 eta 8 Lrp=0. Bi proteinak azaltzen ziren 34 kasuetan: 24 Pgp eta Lrp, 5 Mrp1 eta Pgp, 5 Mrp1 eta Lrp. Hiru proteinak ikusten ziren 17 kasuetan. Ez dugu ikusi erlaziorik adina eta proteina hauen espresio artean: Pgp ($p=0.74$), Mrp1 ($p=0.95$) edo Lrp ($p=0.26$) eta ez da sexuen artean ($p=0.72$) ere. Ez dugu ikusi ezberdintasunik tumore estadioa kontutan hartuta izan denean ($p=0.55$) edo tumore mota ikertu denean ($p=0.21$). Berdina gertatu da gradu histologikoa kontutan hartuta izan denean ($p=0.59$) bai proteina bat soilik agertzen denean edo beste baterekin elkarturik dagoenean. Pgp-k eta Lrp-k tendentzia dute elkarturik azal izan dezan ($p<0.01$), baina berdina ez da gertatzen Pgp eta Mrp1 –ekin ($p=0.18$) edo Mrp1 eta Lrp –ekin ($p=0.26$) kontutan hartzen direnean.

Ondorioak. Birikako minbiziaz maiz erakusten ditu MDR-proteinak. Ikertuak izan diren hirugandik – Pgp, Mrp1 eta Lrp - Lrp gehien azaltzen dena da. Ez da garbi ikusten zer nolako balorea duten proteina hauek birikako minbiziaren bizi-iraupenean.

Hitz gakoak: MDR-proteinak, Minbizia, Birika, Bizi iraupena

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón por su frecuencia y elevada mortalidad constituye un importante problema sanitario. A pesar de que es posible prevenirlo, incidiendo sobre el hábito de fumar, los datos epidemiológicos actuales no auguran un futuro muy esperanzador, al menos a medio plazo. Su incidencia a nivel mundial aumenta continuamente a expensas de los países industrializados y, sobre todo de los que están camino de ello (1).

Con los tratamientos actuales solo tienen opción de curación los pacientes diagnosticados en los estadios iniciales de la enfermedad (2), pero la falta de un método eficaz de diagnóstico precoz, hace que la mayoría de pacientes se presenten con enfermedad avanzada. Además, la incidencia de recidivas tras un tratamiento, en teoría radical, es elevada (2). Por estos motivos, la mayoría de pacientes con cáncer de pulmón, van a ser candidatos a recibir tratamiento quimioterápico en algún momento evolutivo de su enfermedad. Desafortunadamente, los resultados de la quimioterapia son actualmente muy modestos: paliación de síntomas y un discreto aumento de supervivencia.

Los procesos genéticos y bioquímicos que condicionan la aparición de un fenotipo celular resistente a la quimioterapia, han sido objeto de intenso estudio en los últimos años (23). Esto ha conducido a la identificación de varios mecanismos celulares fundamentales y ha permitido el diseño de estrategias para intentar vencer la resistencia a la quimioterapia. Algunas de estas estrategias han sido o están siendo testadas a nivel clínico.

La resistencia a la quimioterapia, independientemente de los mecanismos que la produzcan, puede ser innata o adquirida. La resistencia innata sería aquella que presenta un tumor sin contacto previo a los fármacos, mientras que la adquirida sería la que aparece tras el contacto con uno o varios de ellos (4). Existen dos características tumorales, que parecen determinar la resistencia a la quimioterapia: la cinética de crecimiento (5), y en estrecha relación con esta, la aparición de mutaciones espontáneas (6,7).

Muchos tumores al ser tratados con quimioterapia, incluidos los de pulmón, siguen aparentemente las reglas enunciadas por Skipper y Goldie y Coldman (4). La mayor parte de los pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña, no responden al tratamiento quimioterápico desde el principio (8), es decir, presentan resistencia intrínseca o innata.

No existe una definición claramente establecida sobre lo que se considera un tumor "resistente" a nivel clínico. Algunos autores (9) consideran apropiado emplear criterios de valoración de respuesta a la quimioterapia, como los de la OMS (10), considerando sensibles a los tumores con respuesta completa y resistentes o parcialmente resistentes a los demás. Dado que, hasta el momento, no se ha identificado ningún mecanismo que por sí solo confiera resistencia a todos los fármacos conocidos (4,11), es

mu probable, que esta resistencia sea de causa multifactorial.

Clasificar las múltiples causas que pueden originar resistencia a la quimioterapia es difícil (4,7,11). El objetivo principal del tratamiento quimioterápico es conseguir la muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario conseguir que la mayor cantidad de fármaco activo posible, llegue a nivel de su diana molecular, en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia. Tomando como base lo publicado por Lehnert en 1996 (7), podríamos clasificar a los factores causantes de resistencia en extracelulares e intracelulares (12).

La reducción en la acumulación intracelular de los fármacos, es uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a los antineoplásicos. Esto puede producirse por su expulsión a través de la membrana celular (13,14,15,16), por secuestro en vesículas citoplasmáticas (9), por variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma o por alteración en el metabolismo intracelular del fármaco (17).

Las alteraciones de la topoisomerasa II son un ejemplo de cómo una variación en la diana molecular de los fármacos, puede ser causante de resistencia a múltiples drogas. La resistencia ligada a estas enzimas ha sido ampliamente estudiada a nivel experimental (4,15,18)

La célula tumoral puede defenderse de los efectos de la quimioterapia, incluso después de que el medicamento halla alcanzado su objetivo y causado un daño importante (7). Dos alteraciones celulares destacan a este nivel, un aumento en la capacidad de reparación del ADN (15) y, lo que parece más importante, el fallo en la muerte celular programada o apoptosis (12).

La historia de las proteínas causantes de resistencia a múltiples drogas o MDR-proteínas, se inicia en 1973, con el descubrimiento por Keld Dano (19), de la expulsión activa de daunomicina en células tumorales resistentes. Pgp es una glucoproteína de membrana con un peso molecular de 170 kD, por este motivo se la llama también proteína P-170 (20). Pgp actúa como una bomba de expulsión ATP-dependiente, reduciendo la acumulación intracelular de varias sustancias. Mrp es en realidad una familia de varios transportadores celulares. Las Mrp se localizan en la membrana plasmática, formando parte, como la Pgp, de los transportadores ABC, pero también en el retículo endoplasmático, de lo que se infiere que puedan actuar tanto en la expulsión de drogas fuera de la célula como en el secuestro intracelular de estas en vesículas citoplasmáticas (16). Las Mrp son capaces de transportar aniones orgánicos y drogas neutras, conjugadas o no, con sustancias como el glutatión, glucoronatos y sulfatos. Se cree que algunos sistemas de expulsión de conjugados de glutatión ("GS-X pumps"), pueden ser proteínas de la familia Mrp (21,22). Tal es el caso de los "GS-X pumps" que expulsan methotrexate (anión orgánico), los cuales se han

relacionado con Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Mrp5, Mrp6 (23). Por este mismo sistema, también podrían estar relacionadas, con la expulsión de toxinas naturales, sales de metales pesados como el arsénico y con la resistencia a pequeñas moléculas como el cisplatino (8,24). Lrp es una proteína de 110 kilodaltons descubierta a partir de una línea celular de cáncer de pulmón con MDR no ligada a Pgp (25,26). El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 16, cercano al de Mrp). Se la conoce también como MVP (Major Vault Protein), porque constituye el componente proteico mayor de unas organelas celulares llamadas vaults (27). Los vaults, de descripción relativamente reciente (28), son ribonucleoproteínas con una compleja estructura en forma de barril. Los vaults tienen una composición y estructura casi idénticas en especies filogenéticamente tan alejadas como amebas y humanos, lo que parece indicar que su función es esencial para las células eucariotas

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

1. Determinar mediante estudio inmunohistoquímico, la expresión de las proteínas Pgp, Mrp1 y Lrp (MDR-proteínas), en muestras tumorales de pacientes afectados de cáncer de pulmón.
2. Determinar la relación entre la expresión individual de cada MDR-proteínas y su influencia en la supervivencia.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se ha realizado en muestras de tejido tumoral de pacientes diagnosticados y/o tratados de cáncer de pulmón en el Hospital Donostia de San Sebastián entre Abril de 1995 y Junio de 1997.

Obtención y conservación de muestras

1. **Muestras quirúrgicas:** Durante el acto quirúrgico, se tomaban dos muestras de la zona tumoral que se introducían en criotubos y se almacenaban en una cubeta portátil de nitrógeno líquido hasta su procesamiento.
2. **Muestras broncoscópicas:** Se tomaba una muestra que era tratada del mismo modo que las piezas quirúrgicas.

Se recogieron 147 muestras tumorales procedentes de 143 pacientes. De éstas, 35 eran broncoscópicas y 112 quirúrgicas. De 4 pacientes se dispuso de muestra quirúrgica y broncoscópica. No fueron válidas para el estudio 46 muestras: 27 broncoscópicas por ausencia de tumor y 19 quirúrgicas, de las cuales 15 lo fueron por ausencia de tumor, 3 por tratamiento quimioterápico previo, y 1 por tumor de origen no pulmonar. Resultaron válidas para el estudio 101 muestras correspondientes a 99 pacientes.

En dos pacientes se dispuso de muestra broncoscópica y quirúrgica, optándose por procesar únicamente la quirúrgica. Finalmente, el estudio se realizó en 99 muestras de 99 pacientes, 6 de ellas broncoscópicas y 93 quirúrgicas –

Tabla I: Distribución de los 99 pacientes con respecto a las variables clínico-patológicas.

* Carc. con diferenciación neuroendocrina, t. carcinoide.

** Carc. sin especificar

Estudio inmunohistoquímico de las muestras tumorales
Las muestras tumorales criocongeladas fueron sometidas a análisis inmunohistoquímico para la detección de las tres MDR-proteínas, Pgp, Mrp1 y Lrp. Para ello se utilizó la técnica comercial de estreptavidina-biotina (LSAB de DAKO), junto con anticuerpos monoclonales no comerciales, procedentes de un laboratorio de investigación universitario – Universidad Libre de Ámsterdam -.

1. Reactivos utilizados:

Anticuerpos monoclonales:

MRPr1 reconoce la proteína Mrp1

MRPm6 reconoce la proteína Mrp1

LRP-56 reconoce la proteína Lrp

JSB-1 reconoce la proteína Pgp

Sistema de visualización LSAB y Kits de diaminobenzidina (Dako)

Acetona

Suero bovino

PBS (buffer fosfato salino)

VARIABLES DEL ESTUDIO

Variable Dependiente: Expresión de Mdr-proteínas.

Se cuantificó la proporción de células que reaccionaban con el AcMo. Se consideró como positiva, cuando un

10% o más de las células de la preparación expresaban la proteína. El estudio de la expresión de MDR-proteínas y su relación con las diferentes variables clinico-patológicas se realizó de dos formas:

- 1. Individual o independiente:** Analizamos la expresión de cada proteína por separado, sin tener en cuenta si se expresaba sólo o asociada a las otras.
- 2. Simultáneo:** Analizamos la expresión conjunta de MDR-proteínas en los pacientes desde diferentes puntos de vista:

Expresión positiva frente a expresión negativa: Con independencia del número o tipo de proteína expresada.

Número de proteínas expresadas simultáneamente con independencia del tipo: Ninguna, una, dos, o tres.

Número y Tipo de MDR-proteínas expresadas simultáneamente: Ninguna, Pgp, Mrp1, Lrp, Pgp+Lrp, Mrp1+Pgp, Mrp1+Lrp, y las tres a la vez.

Variables Independientes:

- 1.- Edad:
1. Sexo.
2. Tipo histológico.
3. Grado de diferenciación histológico
4. Estadio tumoral:
5. Variables clinico-patológicas (variables independientes)

1. Examen Anatomopatológico

A partir del estudio histoquímico de las muestras criocongeladas, mediante examen en microscopio óptico tras tinción con hematoxilina y eosina (H & E), se comprobó la presencia de tumor y se determinaron las siguientes variables: Tipo histológico y Grado de diferenciación histológico

2. Revisión de historiales clínicos

De los historiales clínicos de los pacientes se recogieron los datos correspondientes a las siguientes variables: edad, sexo, estadio tumoral, intervalo libre de enfermedad, supervivencia y respuesta al tratamiento quimioterápico. Para concretar los tres últimos se realizaron revisiones periódicas, la última en Marzo del 2004. Para determinar la supervivencia fue necesario el contacto telefónico en varios casos, y en otros se consultó el registro de mortalidad del País Vasco, si bien no incluidos en el presente trabajo

RESULTADOS

VARIABLES CLINICO-PATOLOGICAS

La edad media de los 99 pacientes fue de 64 +/- 10,2 años. La serie se compone de 85 hombres y 14 mujeres con una media de edad de 64 +/-9,7 años para los hombres y de 61 +/- 13 años para las mujeres. Presentaban tumores con histología no célula pequeña, 93 pacientes (49 carcinomas escamosos, 37 adenocarcinomas y 7 carcinomas indiferenciados de célula grande), 3 carcinomas

indiferenciados de célula pequeña y 3 con otras histologías (1 carcinoma con diferenciación neuroendocrina, 1 carcinoma sin más especificación y 1 tumor carcinoide). Con respecto al grado de diferenciación histológica, en 20 casos fue bien diferenciado, en 35 moderadamente diferenciado, en 43 pobremente diferenciado, y en 1 paciente no pudo especificarse el grado. Por estadios los 99 pacientes se agruparon de la siguiente forma: Estadio I, 45 casos (Ia 14, Ib 31). Estadio II, 23 casos (IIA 0, IIB 23). Estadio III, 22 casos (IIIA 15, IIIB 7). Estadio IV, 9 casos.

EXPRESIÓN DE MDR-PROTEINAS

En el análisis de la expresión independiente de cada Mdr-proteína, los resultados fueron los siguientes:

Pgp: Sin expresión 50 (50,5%) pacientes, con expresión 49 (49,5%).

Mrp1: Sin expresión 61 (61,6%) pacientes, con expresión 38 (38,4%).

Lrp: Sin expresión 35 (35,4%) pacientes, con expresión 64 (64,6%).

Con respecto a Mrp1, 30 de los 38 pacientes que la expresaban presentaron positividad para los dos anticuerpos monoclonales empleados, mientras que 8 (4 para cada AcMo) fueron positivos solo a uno de ellos. 83 de los 99 pacientes expresaban alguna MDR-proteína, y 16 no expresaban ninguna. La distribución fue la siguiente:

Sin expresión de proteínas: No expresaban ninguna proteína, 16 casos.

Expresión de una proteína: Expresaban una sola proteína, 32 casos: 3 Pgp, 11 Mrp1 y 18 Lrp=0.

Expresión de dos proteínas: Expresaban dos proteínas, 34 casos: 24 Pgp y Lrp, 5 Mrp1 y Pgp, 5 Mrp1 y Lrp=0.

Expresión de las tres proteínas: Expresaban las tres proteínas, 17 casos

HISTOLOGÍA

En el análisis de la expresión independiente de cada Mdr-proteína, con respecto a la histología, los resultados fueron los siguientes:

Pgp: De los 49 carcinomas escamosos, expresaban Pgp 26 (53,1%), de los 37 adenocarcinomas lo hacían 20 (54,1%), de los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande 3 (42,9%), de los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña ninguno (0%) y de los 3 casos con otras histologías ninguno (0%).

Mrp1: De los 49 carcinomas escamosos, expresaban Mrp1 31 (63,3%), de los 37 adenocarcinomas lo hacían 2 (5,4%), de los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande 3 (42,9%),

de los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña 1 (33,3%) y de los 3 casos con otras histologías 1, el caso definido como carcinoma sin más especificación (33,3%).

Lrp: De los 49 carcinomas escamosos, expresaban Lrp 29 (59,2%), de los 37 adenocarcinomas lo hacían 29 (78,4%), de los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande 6 (85,7%), de los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña ninguno (0%) y de los 3 casos con otras histologías ninguno (0%).

Hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes tipos histológicos con respecto a la expresión individual de Mrp1 ($p=0.000$), o Lrp ($p=0.01$), pero no de Pgp ($p=0.16$).

Al estudiar la expresión simultánea de MDR-proteínas, encontramos que expresaban alguna proteína el 100% (7/7) de los carcinomas indiferenciados de célula grande, el 90% (44/49) de carcinomas escamosos, el 81% (31/37) de adenocarcinomas, 1 de los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña y el caso del carcinoma sin más especificación, siendo la distribución la siguiente:

Sin expresión de proteínas: De los 49 carcinomas escamosos no expresaban ninguna proteína 5 (10,2%), de los 37 adenocarcinomas 7 (18,9%), de los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande ninguno (0%), de los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña 2 (66,6%) y de los 3 casos con otras histologías 2, el carcinoma con diferenciación neuroendocrina y el tumor carcinoide (66,6%).

Expresión de una sola proteína: De los 49 carcinomas escamosos expresaban una sola proteína 16 (32,7%): 2 Pgp, 8 Mrp1, 6 Lrp=0. De los 37 adenocarcinomas 11 (29,7%): 1 Pgp, 10 Lrp=0. De los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande 3 (42,9%): 1 Mrp1, 2 Lrp=0. De los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña 1 (33,3%): Mrp1. De los 3 casos con otras histologías 1, el caso definido como carcinoma sin más especificación (33,3%): Mrp1.

Expresión de dos proteínas: De los 49 carcinomas escamosos expresaban dos proteínas 14 (28,6%): 5 Pgp y Lrp, 5 Mrp1 y Pgp, 4 Mrp1 y Lrp=0. De los 37 adenocarcinomas 17 (45,9%): 17 Pgp y Lrp=0. De los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande 3 (42,9%): 2 Pgp y Lrp, 1 Mrp1 y Lrp=0. De los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña ninguno (0%). De los 3 casos con otras histologías ninguno (0%).

Expresión de las tres proteínas: De los 49 carcinomas escamosos expresaban las tres proteínas 14 (28,6%). De los 37 adenocarcinomas 2 (5,4%). De los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande 1 (14,3%). De los 3 carcinomas indiferenciados de célula pequeña ninguno (0%). De los 3 casos con otras histologías ninguno (0%). Al realizar el análisis de la expresión simultánea de MDR-proteínas, también detectamos diferencias significativas entre los diferentes tipos histológicos, tanto para el

número ($p=0.02$), como para el tipo ($p=0.002$) de MDR-proteínas expresadas simultáneamente.

GRADO DE DIFERENCIACIÓN

En el análisis de la expresión independiente de cada Mdr-proteína, con respecto al grado de diferenciación, los resultados fueron los siguientes:

Pgp: De de los 20 tumores bien diferenciados expresaban Pgp 13 (65%), de los 35 moderadamente diferenciados 16 (45,7%), y de los 43 pobremente diferenciados 20 (46,5%).

Mrp1: De de los 20 tumores bien diferenciados expresaban Mrp1 10 (50%), de los 35 moderadamente diferenciados 11 (31,4%), y de los 43 pobremente diferenciados 16 (37,2%).

Lrp: De de los 20 tumores bien diferenciados expresaban Lrp 14 (70%), de los 35 moderadamente diferenciados 25 (71,4%), de los 43 pobremente diferenciados 25 (58,1%).

No hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes grados histológicos con respecto a la expresión individual de Pgp ($p=0.35$), Mrp1 ($p=0.32$), o Lrp ($p=0.31$).

En el análisis de la expresión simultánea de MDR-proteínas, encontramos que expresaban alguna de estas el 90% (18/20) de los tumores bien diferenciados, el 82,9% (29/35) de los moderadamente diferenciados, y el 81,4% (35/43) de los pobremente diferenciados, siendo la distribución la siguiente:

Sin expresión de proteínas: De los 20 tumores bien diferenciados no expresaban ninguna proteína 2 (10%), de los 35 moderadamente diferenciados 6 (17,1%), y de los 43 pobremente diferenciados 8 (18,6%).

Expresión de una sola proteína: De los 20 tumores bien diferenciados expresaban una sola proteína 5 (25%), de los 35 moderadamente diferenciados 10 (28,6%), y de los 43 pobremente diferenciados 16 (37,2%).

Expresión de dos proteínas: De los 20 tumores bien diferenciados expresaban dos proteínas 7 (35%): 5 Pgp y Lrp, 2 Mrp1 y Pgp=0. De los 35 moderadamente diferenciados 15 (42,9%): 11 Pgp y Lrp, 1 Mrp1 y Pgp, 3 Mrp1 y Lrp=0. De los 43 pobremente diferenciados 12 (27,9%): 8 Pgp y Lrp, 2 Mrp1 y Pgp, 2 Mrp1 y Lrp=0.

Expresión de las tres proteínas: De los 20 tumores bien diferenciados expresaban las tres proteínas 6 (30%), de los 35 moderadamente diferenciados 4 (11,4%), y de los 43 pobremente diferenciados 7 (16,3%).

Tampoco detectamos diferencias significativas entre los diferentes grados histológicos, tanto para el número ($p=0.59$), como para el tipo ($p=0.51$) de MDR-proteínas expresadas simultáneamente.

Tabla II. Expresión de MDR proteínas en relación al Estadio tumoral

Tipo y número de MDR-p	ESTADIO TUMORAL				Total
	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV	
Ninguna	10 22,2%	2 8,7%	2 9,1%	2 22,2%	16 16,2%
Pgp	1 2,2%	2 8,7%	0 0,0%	0 0,0%	3 3,0%
Mrp1	5 11,1%	1 4,3%	2 9,1%	3 33,3%	11 11,1%
Lrp	5 11,1%	8 34,8%	4 18,2%	1 11,1%	18 18,2%
Pgp+Lrp	12 26,7%	3 13,0%	7 31,8%	2 22,2%	24 24,2%
Mrp1+Pgp	3 6,7%	1 4,3%	1 4,5%	0 0,0%	5 5,1%
Mrp1+Lrp	0 0,0%	3 13,0%	2 9,1%	0 0,0%	5 5,1%
Pgp+Mrp1+Lrp	9 20,0%	3 13,0%	4 18,2%	1 11,1%	17 17,2%
Total	45 100,0%	23 100,0%	22 100,0%	9 100,0%	99 100,0%

ESTADIO

En el análisis de la expresión independiente de cada Mdr-proteína, con respecto al estadio, los resultados fueron los siguientes:

Pgp: De los 45 estadios I expresaban Pgp 25 (55,6%), de los 23 estadios II 9 (39,1%), de los 22 estadios III 12 (54,5%), y de los 9 estadios IV 3 (33,3%).

Mrp1: De los 45 estadios I expresaban Mrp1 17 (37,8%), de los 23 estadios II 8 (34,8%), de los 22 estadios III 9 (40,9%), y de los 9 estadios IV 4 (44,4%).

Lrp: De los 45 estadios I expresaban Lrp 26 (57,8%), de los 23 estadios II 17 (73,9%), de los 22 estadios III 17 (77,3%), y de los 9 estadios IV 4 (44,4%).

No hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes estadios con respecto a la expresión individual de Pgp ($p=0.42$), Mrp1 ($p=0.95$), o Lrp ($p=0.17$).

Al realizar el análisis de la expresión simultánea de MDR-proteínas, encontramos que expresaban alguna de estas el 77,8% (35/45) de los tumores en estadio I, el 91,3% (21/23) de los estadios II, el 90,9% (20/22) de los estadios III, y el 77,8% (7/9) de los tumores en estadio IV, siendo la distribución la siguiente:

Sin expresión de proteínas: De los 45 tumores en estadio I no expresaban ninguna proteína 10 (22,2%), de los 23 en estadio II 2 (8,7%), de los 22 en estadio III 2 (9,1%), y de los 9 en estadio IV 2 (22,2%).

Expresión de una sola proteína: De de los 45 tumores en estadio I expresaban una sola proteína 11 (24,4%): 1 Pgp, 5 Mrp1 y 5 Lrp=0. De los 23 en estadio II 11 (47,8%): 2 Pgp, 1 Mrp1 y 8 Lrp=0. De los 22 en estadio III 6 (27,3%): 2 Mrp1 y 4 Lrp=0. De los 9 en estadio IV 4 (44,4%): 3 Mrp1 y 1 Lrp=0.

Expresión de dos proteínas: De de los 45 tumores en estadio I expresaban dos proteínas 15 (33,3%): 12 Pgp y Lrp, 3 Mrp1 y Pgp=0. De los 23 en estadio II 7 (30,4%): 3 Pgp y Lrp, 1 Mrp1 y Pgp, y 3 Mrp1 y Lrp=0. De los 22 en estadio III 10 (45,5%): 7 Pgp y Lrp, 1 Mrp1 y Pgp, y 2 Mrp1 y Lrp=0. De los 9 en estadio IV 2 (22,2%): 2 Pgp y Lrp=0.

Expresión de las tres proteínas: De de los 45 tumores en estadio I expresaban las tres proteínas 9 (20%), de los 23 en estadio II 3 (13,0%), de los 22 en estadio III 4 (18,2%), y de los 9 en estadio IV 1 (11,1%).

Tampoco detectamos diferencias significativas entre los diferentes estadios tumorales, tanto para el número ($p=0.55$), como para el tipo ($p=0.21$) de MDR-proteínas expresadas simultáneamente.

SUPERVIVENCIA

En Marzo del 2004, fecha de la última actualización de datos, con una mediana de seguimiento en los pacientes vivos de 87 meses (68-104), 78 pacientes habían fallecido, 16 vivían y 5 se consideraron perdidos sin evidencia de enfermedad neoplásica a los 35, 26, 21, 17 y 4 meses de seguimiento. De los 78 fallecidos, 47 lo fueron en relación al cáncer de pulmón, 18 murieron por causas aparentemente no relacionadas con este y en 13 pacientes no se pudo aclarar la causa de la muerte. De los 16 pacientes vivos 1 presentaba recurrencia locorregional

Tabla III: Estado de los 99 pacientes en la última actualización (Marzo/04).

Exitus: 78	47 Cáncer de pulmón 18 Causa no tumoral: 7 respiratorias 6 postoperatorias 3 cardiovasculares 2 otras 13 Causa no aclarada
Vivos: 16	15 Sin evidencia de tumor 1 con recidiva loco-regional
Perdidos: 5	

Supervivencia libre de enfermedad

La mediana del supervivencia libre de enfermedad para toda la muestra se situó en 17 meses, y el porcentaje de pacientes vivos y libres de enfermedad a 5 años fue de 21,2%. – Tabla 4 y 5 -.

En el análisis individual de la expresión de cada MDR-proteína los resultados fueron los siguientes:

Pgp: En los 50 pacientes sin expresión de Pgp, la mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 17 meses y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 18%. En los 49 pacientes con expresión, la mediana del supervivencia libre de enfermedad fue de 16 meses y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 24,4%.

Mrp1: En los 61 pacientes sin expresión de Mrp1, la mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 17 meses y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 18%. En los 38 pacientes con expresión, la mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 19 meses y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 26,3%.

Lrp: En los 35 pacientes sin expresión de Lrp, la mediana del supervivencia libre de enfermedad fue de 21 meses y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 25,7%. En los 64 pacientes con expresión, la mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 13

meses y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 18,7%.

No detectamos ninguna relación significativa entre la supervivencia libre de enfermedad y la expresión de Pgp ($p=0.21$), Mrp1 ($p=0.51$), o Lrp ($p=0.41$).

En cuanto a la expresión simultánea de MDR-proteínas, los resultados fueron los siguientes:

Sin expresión de proteínas: La mediana de supervivencia libre de enfermedad de los 16 pacientes que no expresaban ninguna MDR-proteína fue de 19 meses, y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 12,5%

Expresión de una proteína: La mediana de supervivencia libre de enfermedad para el grupo de 32 pacientes que expresaban una sola proteína, fue de 17 meses, y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 21,8%. Según el tipo de proteína expresada los resultados fueron: Pgp (3 casos) 83 meses y 66%, Mrp1 (11 casos) 21 meses y 27,2%, Lrp (18 casos) 13 meses y 11,1%.

Expresión de dos proteínas: La mediana de supervivencia libre de enfermedad para el grupo de 34 pacientes que expresaban dos proteínas, fue de 18 meses, y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 26,4%. Según el tipo de proteínas expresadas los resultados fueron: Pgp y Lrp (24 casos) 16 meses y 20,8%, Mrp1 y Pgp (5 casos) 25 meses y 40%, Mrp1 y Lrp (5 casos) 27 meses y 40%.

Expresión de las tres proteínas: La mediana de supervivencia libre de enfermedad para el grupo de 17 pacientes que expresaban las tres proteínas, fue de 10 meses, y la Supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 17,6%.

No apreciamos ninguna relación significativa entre la supervivencia libre de enfermedad y el número ($p=0.66$), o el tipo ($p=0.70$) de MDR-proteínas expresadas de forma simultánea

Con respecto a las otras variables clinico-patológicas, la supervivencia libre de enfermedad se ha relacionado significativamente con el sexo, y el estadio. Las mujeres tienen una mediana de supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia libre de enfermedad a 5 años menor que los hombres: 9 meses y 14,2% versus 19 meses y 22,3%, respectivamente ($p=0.04$). Con respecto al estadio, las diferencias son más significativas con una mediana de 30 meses y un 28,8% a 5 años en los estadios I, 16 meses y 34,4% para los estadios II, 6 meses y 0% para los estadios III, 2 y 11,1% para los estadios IV ($p=0.01$)

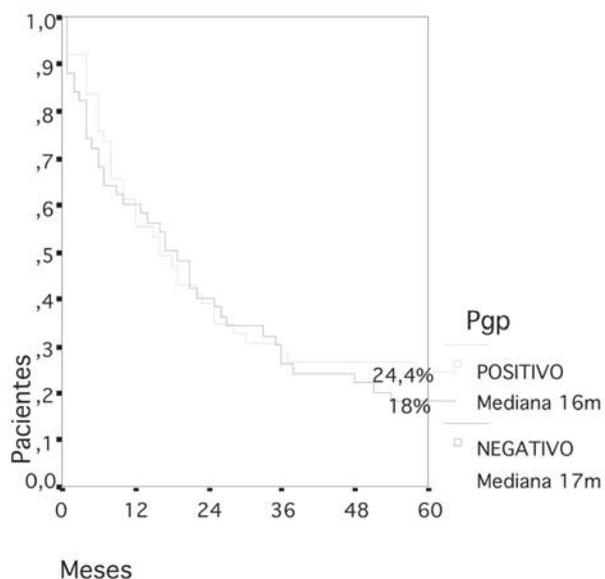
Supervivencia global

La supervivencia global a 5 años, para toda la muestra, fue del 24,2%, con una mediana de de 23 meses.

En el análisis de la expresión independiente de cada Mdr-proteína, los resultados fueron los siguientes:

Pgp: En los 50 pacientes sin expresión de Pgp, la supervivencia global a 5 años fue del 20% y la mediana de 21 meses. En los 49 pacientes con expresión, la supervivencia global a 5 años fue del 28,5% y la mediana de 25 meses.

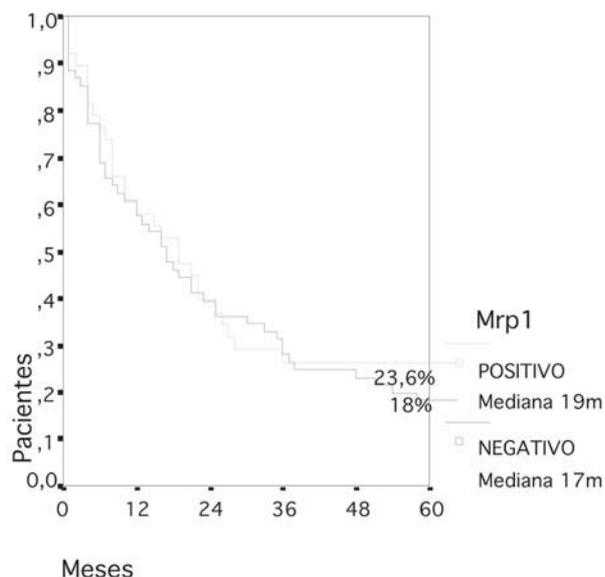
Tabla VI: Supervivencia libre de enfermedad: Pgp



No significativo, p.21

Mrp1: En los 61 pacientes sin expresión de Mrp1, la supervivencia global a 5 años fue del 22,9% y la mediana de 23 meses. En los 38 pacientes con expresión, la supervivencia global a 5 años fue del 26,3% y la mediana de 22 meses–

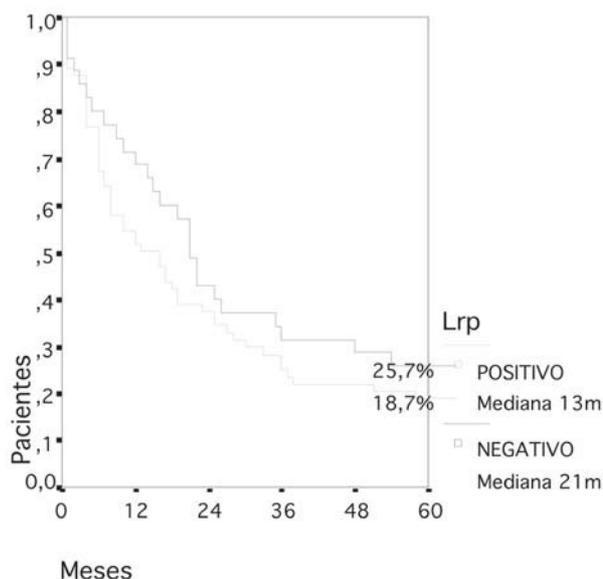
Tabla VII: Supervivencia libre de enfermedad: Mrp1



No significativo, p.51

Lrp: En los 35 pacientes sin expresión de Lrp, la supervivencia global a 5 años fue del 25,7% y la mediana de 21 meses. En los 6 pacientes con expresión, la supervivencia global a 5 años fue del 18,7% y la mediana de 13 meses. –

Tabla VIII: Supervivencia libre de enfermedad: Lrp



No significativo, p.41

No detectamos ninguna relación significativa entre la supervivencia global y la expresión de Pgp ($p=0,07$), Mrp1 ($p=0,91$), o Lrp ($p=0,70$)

Al analizar la expresión simultánea de MDR-proteínas, Los resultados fueron los siguientes:

Sin expresión de proteínas: En los 16 pacientes que no expresaban ninguna MDR-proteína la supervivencia global a 5 años fue del 18,7% y la mediana de 25 meses.

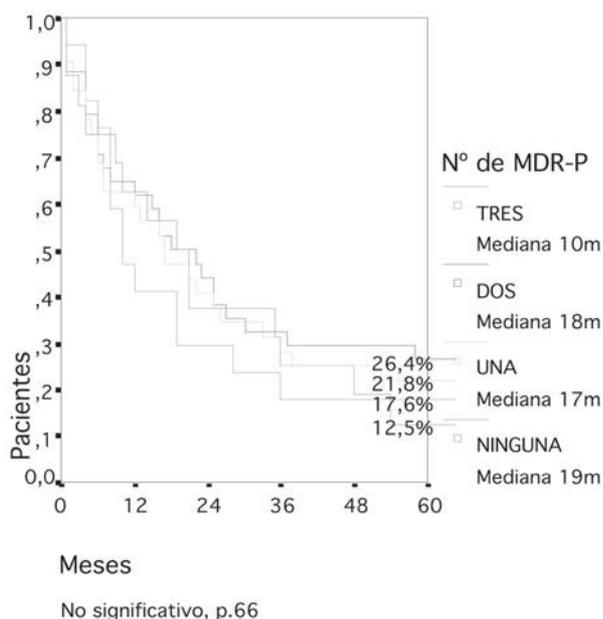
Expresión de una proteína: En los 32 pacientes que expresaban una sola proteína, la supervivencia global a 5 años fue del 21,8% y la mediana de 17 meses. Según el tipo de proteína expresada los resultados fueron: Pgp (3 casos) 66% y 83 meses, Mrp1 (11 casos) 27,2% y 21 meses, Lrp (18 casos) 11,1% y 17 meses.

Expresión de dos proteínas: En los 34 pacientes que expresaban dos proteínas, la supervivencia global a 5 años fue del 32,3% y la mediana de 30 meses. Según el tipo de proteínas expresadas los resultados fueron: Pgp y Lrp (24 casos) 29,1% y 23 meses, Mrp1 y Pgp (5 casos) 40% y 31 meses, Mrp1 y Lrp (5 casos) 40% y 31 meses.

Expresión de las tres proteínas: La supervivencia global para el grupo de 17 pacientes que expresaban las tres proteínas fue del 17,6% y la mediana de 20 meses.

Tampoco detectamos ninguna relación significativa entre supervivencia global y el número ($p=0,25$), o el tipo ($p=0,45$) de MDR-proteínas expresadas simultáneamente

Tabla IX: Supervivencia libre de enfermedad: Número de MDR-proteínas expresadas



Con respecto a las otras variables clinico-patológicas, la supervivencia global se ha relacionado significativamente solo con el estadio. Los estadios I tienen una mediana de 36 meses y una supervivencia global a 5 años del 35,5%, los estadios II de 18 meses y 30,4%, los estadios III de 14 meses y 0%, y los estadios IV de 6 meses y 11,1% respectivamente ($p=0.01$)

DISCUSION

No existen en la actualidad datos concluyentes sobre si la expresión de estas proteínas puede estar implicada en la

resistencia a la quimioterapia del cáncer de pulmón. La resistencia a la quimioterapia de los enfermos con cáncer de pulmón es un hecho evidente en la práctica clínica diaria. De forma intrínseca o adquirida esta resistencia afecta a variados agentes antineoplásicos, por lo que presumiblemente se deba a múltiples factores.

El primer paso para averiguar si los mecanismos causantes de resistencia a múltiples drogas in vitro, están implicados en los malos resultados de la quimioterapia en el cáncer de pulmón, sería demostrar la presencia de alguno o varios de estos mecanismos en los pacientes con dicho tumor. Dada la frecuencia de esta neoplasia, cualquier mejora en la eficacia del tratamiento por pequeña que fuese, podría beneficiar a miles de personas. La resistencia a la quimioterapia es uno de los principales obstáculos a superar para mejorar esta eficacia.

Nuestro estudio tenía como primer objetivo determinar la expresión de tres MDR-proteínas en el cáncer de pulmón. Los resultados de nuestro estudio confirman la presencia de MDR-proteínas en el cáncer de pulmón. La proteína más expresada fue Lrp, con positividad en el 64% de pacientes, seguida de Pgp en 49% y Mrp1 en 38%. Estos resultados son parecidos a los que refleja la literatura. Los trabajos iniciales sobre MDR-proteínas en cáncer de pulmón estudiaban la expresión de Pgp y se realizaron hace ya algunos años. Estos primeros estudios, salvo el publicado por Radosevich en 1989 (33), detectaron una baja expresión de esta proteína, por lo que durante algunos años se aceptó como establecido que Pgp no se expresaba en el cáncer de pulmón y por lo tanto no podía influir en el mal resultado de la quimioterapia. Posteriores estudios han demostrado una mayor expresión de Pgp, que por inmunohistoquímica se sitúa entre un 35% y un 52%. Sobre muestras congeladas, Beer y cols (30) y Scagliotti y cols (34), encontraron una expresión del 35% y 41% respectivamente en pacientes con carcinomas de pulmón no célula pequeña. Nosotros hemos encontrado un 49% de expresión de Pgp, 51% si consideramos solo los casos de carcinoma no célula pequeña, resultado

Tabla X

Tipo y número de MDR-proteínas	Supervivencia		Intervalo libre de enfermedad		Nº de Pacientes	
	Mediana	% a 5 años	Mediana	% a 5 años		
Ninguna	25	18,7%	19	12,5%	16	
Una	Pgp	83	66%	83	66%	3
	Mrp1	21	27,2%	21	27,2%	11
	Lrp	17	11,1%	13	11,1%	18
	Total	17	21,8%	17	21,8%	32
Dos	Pgp+Lrp	23	29,1%	16	20,8%	24
	Mrp1+Pgp	31	40%	25	40%	5
	Mrp1+Lrp	31	40%	27	40%	5
	Total	30	32,3%	18	26,4%	34
Tres	Pgp+Mrp1+Lrp	20	17,6%	10	17,6%	17
Total	23	24,2%	17	21,2%	99	

parecido a lo publicado por estos autores y que confirma la existencia de una expresión relevante de Pgp en estos tumores.

El abanico de resultados publicados para Mrp1 es más amplio, y se sitúa entre el 38% y el 88%, pero ninguno de los trabajos con un número considerable de casos emplea material congelado. El resultado de nuestro estudio se sitúa en un nivel bajo para esta proteína, 38%, al igual que el de Sugawara y cols (35).

La proteína con mayor expresión ha sido Lrp, con 64 % de casos. Los trabajos inmunohistoquímicos que incluyen mayor número de pacientes se realizaron en muestras conservadas en parafina, y la expresión de Lrp fue del 45%, 57%, y 59% respectivamente. Un estudio sobre tejido congelado, pero con 36 pacientes, detectó nada menos que un 86% de expresión.

Un aspecto importante de nuestro estudio que lo diferencia de la mayoría de los publicados, es la determinación de la expresión simultánea de las tres MDR-proteínas en un mismo paciente. La presumible existencia e interacción de diferentes mecanismos de resistencia in vivo, justifican dicha importancia. Estudiada la muestra bajo este punto de vista, encontramos que el 83% de los pacientes expresaban proteínas, con 32% expresando una, 34% expresando dos y 17% expresando las tres. Es decir el 51% de los pacientes expresaban más de una proteína.

Existen pocas publicaciones que hagan referencia a la simultaneidad de expresión de estas tres MDR-proteínas en cáncer de pulmón. Zhou y cols (36), en 30 pacientes con NSCLC, encuentran que alrededor de un 40% expresan a la vez Pgp, Mrp1 y Lrp, un porcentaje superior al 17% obtenido por nosotros, pero Zhou y cols emplean muestras conservadas en parafina y el número de casos es menor. En este estudio, aunque los autores no hacen mención expresa de ello, también es Lrp la proteína más expresada, con un 87% de casos. Nuestro estudio detecta una tendencia muy significativa de Pgp y Lrp a expresarse asociadas (41% de casos). Un resultado similar al obtenido por Volm y cols (37), que en 87 pacientes refieren un 32% de expresión simultánea de Pgp y Lrp.

Otros mecanismos de resistencia como las alteraciones en la glutatión S-transferasa- π o las mutaciones de la p53, se han detectado a la vez que algunas MDR-proteínas, en cáncer de pulmón. Tal es el caso de la glutatión S-transferasa- π con Pgp y Lrp, o de una p53 mutada con Mrp1 (y Pgp). Esta tendencia a la asociación entre diferentes mecanismos de resistencia, pueden ser debidos a la existencia de factores comunes de regulación.

Con respecto al grado de diferenciación histológico aunque sin alcanzar la significación, si hemos notado que la expresión de cualquiera de las proteínas tiende a ser mayor en los tumores bien diferenciados que en los pobremente diferenciados: 13/20 (65%) vs 20/43 (46,5%) para Pgp, 10/20 (50%) vs 16/43 (37,2%) para Mrp1, y 14/20 (70%) vs 25/43 (58,1%) para Lrp. Algunos autores si que encontraron que esta disminución de

expresión conforme el tumor se desdiferencia era significativa.

Es en relación a la histología, donde se han publicado los resultados más discrepantes. Algunos estudios detectan una menor expresión de MDR-proteínas en los carcinomas indiferenciados de célula pequeña que en los de célula no pequeña, pero otros no. Los pocos estudios de los revisados, que incluyen más de 30 pacientes con carcinomas indiferenciados de célula pequeña, revelan una expresión de Pgp que oscila entre el 12% para Segawa y cols (38) y el 26% de Hsia y cols (39). Para Mrp1 la expresión oscila menos, entre un 31% y un 34% publicado por Hsia y cols (39). En cuanto a Lrp los estudios son escasos y poco valorables, y según el método de detección empleado varían del 0% de expresión hasta el 100% de Oguri y cols (37). Nosotros dispusimos de solo 3 casos de carcinoma indiferenciado de célula pequeña, un número muy pequeño para extraer conclusiones válidas. Detectamos expresión solo en 1 caso (33,3%) y este lo fue únicamente para Mrp1, solo con el AcMo Mrpm6 y en límite inferior de lo considerado positivo (10% de células teñidas en la preparación).

Varios autores no encuentran relación entre los diferentes subtipos histológicos de carcinomas no célula pequeña y la expresión de Pgp, Mrp1, o Lrp. En cambio, algunos describen una preferencial expresión de Pgp y fundamentalmente Mrp1 en carcinomas escamosos frente a adenocarcinomas, mientras otros encuentran precisamente lo contrario. Nosotros encontramos diferencias significativas en la expresión de Lrp y Mrp1 entre los diferentes tipos histológicos. Las más llamativas se dan en la expresión de Mrp1, la cual es muy baja en adenocarcinomas frente a indiferenciados de célula grande y escamosos, con porcentajes de 5,4%, 42,9% y 63,3% respectivamente. En la menor expresión de Mrp1 en adenocarcinomas coincidimos con algunos autores. En cambio, Lrp se expresa menos en los carcinomas escamosos que en adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de célula grande (59,2% 78,4%, 85,7% respectivamente), con lo que discrepamos aunque solo parcialmente con alguna publicación que encontraba mayor expresión de Lrp en adenocarcinomas y carcinomas escamosos que en indiferenciados de célula grande, y por lo que sus autores sugerían una relación entre Lrp y la diferenciación histológica tumoral. No encontramos diferencias en la expresión de Pgp.

Para los tipos histológicos más frecuentes, la proporción de pacientes que expresan alguna o varias proteínas en nuestro estudio es similar, con un 90% para los carcinomas escamosos, 81% para los adenocarcinomas, y 100% para los carcinomas indiferenciados de célula grande. Pero entre ellos difieren significativamente en el tipo y el número de proteínas que expresan. Los porcentajes de pacientes con carcinomas escamosos que expresan una, dos, o las tres proteínas a la vez son similares: 32,7% (16/49), 28,6% (14/49) y 28,6% (14/49) respecti-

vamente. En cambio, en adenocarcinomas e indiferenciados de célula grande es mucho menos frecuente encontrar pacientes que expresen las tres proteínas simultáneamente: 5,4% (2/37) y 14,3% (1/7) respectivamente. Esto esta fundamentalmente relacionado con la baja expresión de Mrp1 en adenocarcinomas. Por este motivo, 14 de los 17 casos que expresan simultáneamente las tres proteínas, son carcinomas escamosos. Los adenocarcinomas expresan con frecuencia y de forma simultánea Pgp y Lrp (17 de 37 casos, 45,9%) y también Lrp sola (10 de 37 casos, 27%). En los carcinomas escamosos Pgp y Lrp aparecen juntas solo en 5 de los 49 casos (10,2%), y Lrp sola en 6 casos (12,2%). Los 7 carcinomas indiferenciados de célula grande no tienen predilección por expresar simultáneamente ninguna combinación de proteínas.

Hemos estudiado la tendencia de las MDR-proteínas a expresarse asociadas o no entre ellas, y en caso de asociarse con cual. Todas se presentan con más frecuencia asociadas a otras que solas. A destacar la relación entre Pgp y Lrp. Pgp se expresa en 44 casos, y de estos lo hace asociada en 41 (93%), en todos ellos con Lrp (41 de 44 casos). La proporción de casos con expresión de Lrp que se asocian a Pgp es del 64% (41/64). Esta tendencia de Pgp y Lrp a expresarse juntas, alcanza la significación estadística.

Hemos detectado alguna diferencia con respecto al sexo. En nuestro estudio, las mujeres expresan menos Mrp1 que los hombres. Esto puede deberse a que 9 de las 14 mujeres presentaban adenocarcinomas, tipo histológico que ha resultado expresar muy poco esta proteína. Ninguno de los trabajos revisados que hacen referencia al sexo, han encontrado relación entre este y la expresión de MDR-proteínas, pero solo uno de ellos estudiaba en concreto Mrp1. No encontramos diferencias entre sexos para Pgp y Lrp, ni tampoco en cuanto al número de proteínas expresadas simultáneamente.

El aspecto más importante del estudio de las MDR-proteínas en cáncer es lógicamente su implicación en la respuesta a la quimioterapia y a la supervivencia. En éste sentido existe poca información disponible en el cáncer e pulmón. De acuerdo con los resultados de ésta serie no encontramos diferencias significativas en cuanto a los pacientes y la expresión de la MDR-proteínas analizadas y consideradas tanto de forma aislada como asociada: Lrp ($p=0,41$), Mrp1 ($p=0,51$), Pgp ($p=0,21$) o cuando se expresan las tres asociadas ($p=0,56$). Mientras que en algunos tipos de tumores hematológicos esta implicación está claramente establecida, en tumores sólidos, los datos son muy variados y poco concluyentes a este respecto (32). Hasta la fecha, en cáncer de pulmón, no se puede excluir ni afirmar tal implicación (41,42).

CONCLUSIONES

1. El cáncer de pulmón expresa con frecuencia MDR-proteínas.
2. De las tres MDR-proteínas estudiadas, Pgp Mrp1 y Lrp, es Lrp la más frecuentemente expresada. Los adenocarcinomas expresan menos Mrp1 que el resto de los tipos histológicos. Los carcinomas escamosos expresan menos Lrp que los adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de célula grande. Una proporción importante de pacientes expresan de forma simultánea más de una MDR-proteína. Los carcinomas escamosos, son los que con más frecuencia expresan Pgp, Mrp1 y Lrp de forma simultánea.
3. No encontramos relación significativa en cuanto a la supervivencia y la expresión de Lrp ($p=0,41$), Mrp1 ($p=0,51$), Pgp ($p=0,21$) tanto aisladamente o cuando se expresan las tres asociadas ($p=0,56$).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cardenal F, Lopez -Cabrerizo MP, Anton A et al: Randomized phase III study of gemcitabine-cisplatin versus etoposide-cisplatin in the treatment of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 12-18.
- 2.- Carney DN, Shepherd FA. Treatment of SCLC: Chemotherapy. *Textbook of Lung Cancer*. Editado por Heine H Hansen. Martin Dunitz Ltd, London 2000: 261-272.
- 3.- Carr IB, Pleiotropic drug resistance in hepatocytes induced by carcinogens administered to rats. *Cancer Res* 1987; 47: 5577-5583.
- 4.- Beck WT, Dalton WS. Mechanisms of Drug Resistance. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 5th Edition. Editado por VT DeVita , S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 1997: 498-512.
- 5.- Chu E, DeVita VT. Principles of Cancer Management: Chemotherapy. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 6th Edition. Editado por VT DeVita , S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 2001: 289-386.
- 6.- Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer treat Rep* 1979; 63 1727-1731.
- 7.- Skipper HE, Simpson-Herren L. Relationship Between Tumor Stem Cell Heterogeneity and Responsiveness to Chemotherapy. *Important Advances in Oncology* 1985. Editado por VT DeVita , S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 1985: 63-77.
- 8.- Shepherd FA, Carney DN. Treatment of NSCLC: Chemotherapy. *Textbook of Lung Cancer*. Editado por Heine H Hansen. Martin Dunitz Ltd, London 2000: 213-242.
- 9.- Nishio K, Nakamura T, Koh Y et al: Drug resistance in lung cancer. *Current Opinion in Oncology* 1999; 11: 109-115.
- 10.- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47(1): 207-214.
- 11.- Doyle LA. Mechanisms of Drug Resistance in Human Lung Cancer Cells. *Semin Oncol* 1993; 20: 326-337.
- 12.- Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001; 2: 33-42
- 13.- Bradshaw D, Arceci RJ. Clinical Relevance of Transmembrane Drug Efflux as a Mechanism of Multidrug Resistance. *J Clin Oncol* 1998; 16(11): 3674-3690.
- 14.- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug Resistance In Cancer : Role Of Atp-Dependent Transporters. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 48-58. .

- 15.-Morrow ChS, Cowan KH. Mechanisms of Antineoplastic Drug Resistance. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 4th Edition. Editado por VT DeVita, S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 1993: 340-348.
- 16.-Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. *Current Opinion in Oncology* 2000; 12: 450-458.
- 17.-Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-Associated Cis-Diammine-Dichloroplatinum (II) Metabolism And ATP-Dependent Efflux From Leukemia Cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 20116-20125.
- 18.- Plasencia C, Tarón M, Abad A, et al. Genes de quimiorresistencia. *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Editado por R. Rosell, A. Abad. M. Monzó. A. Barnadas. Arán Ediciones S.A. Madrid 2000: 145-159.
- 19.- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323: 466-483.
- 20.- Dalton WS. Overcoming the Multidrug-Resistant Phenotype. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. Editado por VT DeVita, S Hellman y SA Rosenberg. JB Lippincott Company, Philadelphia 1993. 2655-2666.
- 21.- Borst P, Evers R, Koel M, et al. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92: 1295-1302.
- 22.- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, et al. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 1994; 54: 4833-4836.
- 23.- Rappa G, Loico A, Flavell R, et al. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res* 1997, 57:5232-5237.
- 24.- Carney DN, Shepherd FA. Treatment of SCLC: Chemotherapy. *Textbook of Lung Cancer*. Editado por Heine H Hansen. Martin Dunitz Ltd, London 2000: 261-272.
- 25.- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, et al. Overexpression of a Mr 110.000 Vesicular Protein in Non-P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance. *Cancer Res* 1993; 53: 1475-1479.
- 26.- Slovak ML, Pelkey Ho J, Cole SPC, et al. The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on cromosoma 16 : Evidence that cromosoma breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res* 1995; 55: 4214-4219.
- 27.- Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, Izquierdo MA, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med* 1995;1: 578-582.
- 28.- Kedersha NL, Rome LH. Isolation and Characterization of a Novel Ribonucleoprotein Particle: Large Structures Contain a Single Species of Small RNA. *J Cell Biol* 1986; 103: 699-709.
- 29.- Boyle P, Gandini S, Gray N. Epidemiology of lung cancer: A century of great success and ignominious failure. *Textbook of Lung Cancer*. Editado por Heine H Hansen. Martín Dunitz Ltd, London 2000: 13-25.
- 30.- Beer TW, Rowlands DC, Crocker J. Detection of the multidrug resistance marker P-glycoprotein by immunohistochemistry in malignant lung tumors. *Thorax* 1996;51(5): 526-529.
- 31.- Simon MF, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91, Abril: 3497-3504.
- 32.- Godstein LJ. MDR1 Gene Expression in Solid Tumours. *Eur J Cancer* 1996; 32A(6): 1039-1050.
- 33.- Radosevich JA, Robinson PG, Rittmann-Grauer LS, et al. Immunohistochemical analysis of pulmonary and pleural tumors with the monoclonal antibody HYB-612 directed against the multidrug-resistance (MDR-1) gene product P-glycoprotein. *Tumor Biol* 1989; 10: 252-257.
- 34.- Scagliotti GV, Novello S, Selvaggi G. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 1999; 10 (Suppl. 5): S83-S86
- 35.- Choi JH, Lim HY, Joo HJ, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein 1, P-glycoprotein, and thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. *Br J Cancer* 2002, 86(10): 1578-85.
- 36.- Zhou J, Higashi K, Ueda Y, et al. Expression of multidrug resistance protein and messenger RNA correlate with (99m)Tc-MIBI imaging in patients with lung cancer. *J Nucl Med* 2001 Oct; 42 (10): 1476-83.
- 37.- Volm M, Mattern J, Samsel B. Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in resistant non-small-cell lung carcinomas of smokers. *Br J Cancer* 1991; 64(4): 700-704.
- 38.- Segawa Y, Ohnoshi T, Hiraki S, et al. Immunohistochemical Detection of P-glycoprotein and Carcinoembryonic Antigen in Small Cell Lung Cancer: With Reference to Predictability of Response to Chemotherapy. *Acta Med Okayama* 1993; 47: 181-189
- 39.- Hsia TC, Lin CC, Wang JJ, et al. Relationship Between Chemotherapy Response of Small Cell Lung Cancer and P-glycoprotein or Multidrug Resistance-Related Protein Expression. *Lung* 2002; 180(3): 173-179.
- 40.-Oguri T, Isobe T, Fujitaka K, et al. Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer* 2001 Aug 15; 93(4): 584-589.
- 41.- Thomas H, Coley HM. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer control* 2003; 10(2): 159-165.
- 42.- Bates SE, Chen C, Robey R, et al: Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology. *Novartis Foundation Symposium* 243, 2002: 83-102.