

# Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos

Alfredo Paredes<sup>a</sup>, José Luis Blanco<sup>b</sup> y Miguel Echenique-Elizondo<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Oncología. Hospital Donostia. San Sebastián. Guipúzcoa.

<sup>b</sup>Departamento de Radioterapia. Hospital Donostia. San Sebastián. Guipúzcoa.

<sup>c</sup>Departamento de Cirugía. Universidad del País Vasco. San Sebastián. Guipúzcoa. España.

## Resumen

Las causas de que una célula tumoral sea resistente a la quimioterapia son muchas y de variada naturaleza. El motivo del presente trabajo es realizar una revisión y una puesta al día de una de estas posibles causas, en concreto, la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos.

**Palabras clave:** Proteínas. Tumores. Tumores sólidos.

## EXPRESSION OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR)-ASSOCIATED PROTEINS IN SOLID TUMORS

The causes of drug resistance in tumor cells vary widely. The present study aims to provide an update of multidrug resistance in tumor cells and, in particular, of multidrug resistance-associated proteins.

**Key words:** Proteins. Tumors. Solid tumors.

## Introducción

El número de líneas de investigación sobre el cáncer es abrumador. Muchas de ellas se basan en la búsqueda de nuevos tratamientos, y otras, no menos importantes, intentan averiguar por qué, a diferencia de bastantes tumores hematológicos, como leucemias y linfomas, la mayoría de tumores sólidos no pueden curarse con quimioterapia.

Sin duda, las causas de que una célula tumoral sea resistente a la quimioterapia son muchas y de variada naturaleza. El motivo del presente trabajo es llevar a cabo una revisión y una puesta al día de una de estas posibles causas, en concreto, la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos.

## Resistencia a la quimioterapia

La resistencia a la quimioterapia, independientemente de los mecanismos que la produzcan, puede ser innata o adquirida. La resistencia innata es aquella que presenta un tumor sin contacto previo a los fármacos, mientras que la adquirida es la que aparece tras el contacto con uno o varios de ellos<sup>1</sup>. Existen 2 características tumorales que parecen determinar la resistencia a la quimioterapia: la cinética de crecimiento y, en estrecha relación con ésta, la aparición de mutaciones espontáneas.

### Cinética de crecimiento

La mayoría de quimioterápicos actúan sobre las células en división, y cuanto menor sea la fracción de crecimiento, es decir, el porcentaje de células con actividad proliferativa, menor será el número de células presumiblemente sensibles al tratamiento. Por ello, las células que se encuentran fuera del ciclo celular, en la llamada fase G0, serán refractarias a la mayoría de quimioterápicos<sup>2</sup>. Skipper et al<sup>3</sup>, hace varias décadas, demostró la influencia de la cinética de crecimiento tumoral en la respuesta a la quimioterapia, con sus estudios de la leucemia de ratones L1210. La leucemia L1210 tiene una fracción de crecimiento del 100% y su población celular aumenta de forma exponencial. Los cálculos efectuados

Correspondencia: Dr. M. Echenique-Elizondo.  
Facultad de Medicina. Unidad Docente de Medicina  
de San Sebastián. Universidad del País Vasco.  
P.º Dr. Beguiristain, 105. 20014 San Sebastián. Guipúzcoa.  
España.  
Correo electrónico: gepecelm@sc.ehu.es

Manuscrito recibido el 28-2-2005 y aceptado el 16-12-2005.

por Skipper et al, tras la administración de quimioterapia a los ratones leucémicos, demostraron que ésta eliminaba células leucémicas también de forma exponencial y que la probabilidad de curación dependía del volumen tumoral inicial. Las condiciones favorables de estos estudios, con ausencia de resistencia al tratamiento y una fracción de crecimiento del 100%, no suelen darse en los tumores sólidos. Los datos experimentales indican que los tumores sólidos crecen siguiendo un modelo gompertziano<sup>2</sup>. Sólo en las fases iniciales, cuando el volumen tumoral es pequeño, crecen exponencialmente como la leucemia L1210. Posteriormente, el crecimiento se enlentece también de forma exponencial, y aumenta el número de células en fase G0. Una importante consecuencia de este tipo de crecimiento es que, en el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes presenta tumores con una baja fracción de crecimiento y, por tanto, con baja sensibilidad a la mayoría de los quimioterápicos<sup>2</sup>.

### Mutación espontánea

En 1979, Goldie y Coldman<sup>4</sup>, aplicando conocimientos sobre las mutaciones espontáneas en algunas bacterias que las hacían resistentes a los virus bacteriófagos, formularon una hipótesis matemática sobre la aparición espontánea de resistencia a la quimioterapia antineoplásica. A través de cambios citogenéticos aleatorios, algunas células tumorales podrían mutar y volverse resistentes a ciertos fármacos, sin contacto previo con ellos. Esta capacidad de resistencia se podría transmitir a las células descendientes, de tal forma que la población celular de un tumor en crecimiento no sería homogénea, y coexistirían clones celulares sensibles y resistentes al tratamiento<sup>4,5</sup>. La hipótesis de Goldie y Coldman establece que la tasa de mutación depende de la inestabilidad genética de cada tumor y que tal acontecimiento suele iniciarse antes de que sea clínicamente detectable. El número de células resistentes en un tumor en el momento del diagnóstico se relacionará directamente con su tamaño y su tasa intrínseca de mutación<sup>4,5</sup>.

Muchos tumores, al ser tratados con quimioterapia, siguen aparentemente las reglas enunciadas por Goldie y Coldman<sup>5</sup>, y Skipper y Simpson-Herren<sup>5</sup>.

### Causas de la resistencia a la quimioterapia

No existe una definición claramente establecida sobre lo que se considera un tumor "resistente" en la clínica. Algunos autores<sup>6</sup> consideran apropiado emplear criterios de valoración de respuesta a la quimioterapia, como los de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>7</sup>, que consideran sensibles los tumores con respuesta completa y resistentes o parcialmente resistentes los demás<sup>8,9</sup>. Ante esta situación, se puede afirmar que la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón, como la mayoría de los pacientes con tumores sólidos, son resistentes a la actual quimioterapia. Dado que, hasta el momento, no se ha identificado ningún mecanismo que, por sí solo, confiera resistencia a todos los fármacos conocidos<sup>1,10</sup>, es muy probable que esta resistencia sea de causa multifactorial.

Clasificar las múltiples causas que pueden originar resistencia a la quimioterapia es difícil<sup>1,10,11</sup>. 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 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<sup>11</sup>, los factores causantes de resistencia se podrían clasificar en extracelulares e intracelulares. Ambos grupos no son completamente independientes y pueden influirse entre sí. Tal es el caso del aumento de expresión de algunas proteínas relacionadas con la resistencia a fármacos que se produce en situaciones de hipoxia por mala vascularización tumoral<sup>12</sup>. La mayor parte de la información sobre mecanismos de resistencia procede de estudios *in vitro*<sup>1,10,12,13</sup>. Aunque cada vez se publican más estudios en la clínica, éstos siguen siendo escasos en comparación con los puramente experimentales, por lo que la verdadera repercusión clínica de estos mecanismos está por determinar<sup>11,13</sup>.

### Factores extracelulares

Prácticamente todos los citostáticos que se han visto afectados *in vitro* por algún mecanismo de resistencia entran en la célula por difusión pasiva<sup>14,15</sup>. Por ello, cuanto mayor sea la concentración extracelular del fármaco, mayor será la cantidad que pasa al interior. Entre los factores que pueden alterar la concentración extracelular de un fármaco se encuentran la administración de una dosis insuficiente, la inactivación metabólica, la dificultad en acceder al tumor por una vascularización tumoral alterada, las barreras fisiológicas, como las existentes en el sistema nervioso central y los testes (zonas anatómicas conocidas como "santuarios" para la quimioterapia), y también la presencia en el tejido intersticial tumoral de sustancias como el colágeno, que dificultarán la difusión del fármaco<sup>11</sup>.

### Factores intracelulares

Con independencia de la cinética de crecimiento, ya sea por mutación espontánea o por exposición a los fármacos, la célula tumoral desarrollará una serie de mecanismos de defensa frente a la quimioterapia. Estos mecanismos de resistencia intracelulares son, posiblemente, la causa fundamental del fracaso del tratamiento<sup>2</sup>. Son múltiples y variados<sup>16,17</sup> y, en general, no se trata de hechos aislados e independientes, sino que han de contemplarse como parte integrante de procesos mucho más complejos, como puede ser el fenómeno de la muerte celular programada o apoptosis<sup>18</sup>. Estos mecanismos se podrían dividir en 3 grupos: los que disminuyen la concentración del fármaco en su diana molecular; las propias alteraciones de la diana molecular, y por último, aquellos que, una vez conseguido el efecto del fármaco sobre su diana, evitan la muerte celular.

### *Disminución de la concentración del fármaco en su diana molecular*

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, por secuestro en vesículas citoplasmáticas, por variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma o por alteración en el metabolismo intracelular del fármaco<sup>11,19</sup>.

#### *Expulsión a través de la membrana celular*

La expulsión del fármaco fuera de la célula es, probablemente, el mecanismo de resistencia más estudiado y, fundamentalmente, está relacionado con la actuación de determinadas proteínas transportadoras<sup>17,19</sup>. Hasta la actualidad se han descubierto 3 proteínas que actúan de esta manera: Pgp (P-glucoproteína), Mrp (*multidrug resistance-associated protein*) y Bcrp (*breast cancer resistance protein*).

#### *Secuestro en vesículas citoplasmáticas y/o por variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma*

En líneas celulares resistentes a la doxorrubicina y el cisplatino<sup>6</sup>, se han detectado cambios en la distribución intracelular de estos fármacos, por alteraciones en el transporte nuclear y por secuestro intracelular en pseudo-vesículas citoplasmáticas. Los mecanismos causantes de esta distribución no son conocidos. Es posible que otra MDR-proteína, denominada Lrp (*lung resistance protein*) esté implicada. Tampoco se descarta que otras proteínas, como Pgp o Mrp, también puedan desempeñar un papel en el secuestro vesicular de fármacos<sup>11</sup>.

#### *Alteración en el metabolismo intracelular del fármaco*

Una vez en el interior de la célula, los fármacos pueden ser inactivados por oxidación y/o conjugación con glutatión (GSH). Familias de isoenzimas, como las glutatión S-transferasas (GST), conjugan el glutatión con varios xenobióticos o fármacos, y desempeñan un importante papel en la detoxificación. La sobreexpresión de GST y el aumento del contenido celular de GSH se han asociado a la resistencia a un agente muy importante en el tratamiento del cáncer de pulmón: el cisplatino<sup>20</sup>, y también a las antraciclinas y alquilantes, como el melfalán, la ciclofosfamida, el thiotepa o la carmustina<sup>11</sup>. La conjugación no es suficiente para que la célula expulse los fármacos, ya que el conjugado (GS-X) es más hidrófilo y no puede salir por difusión pasiva. Para ello, el GS-X necesita las llamadas bombas de GS-X (*GS-X pumps*). Algunas proteínas transportadoras, como la Mrp, pueden actuar como bombas de GS-X<sup>21</sup>. Otra de estas proteínas, la Pgp, parece tener elementos reguladores comunes con la GST- $\pi$ <sup>22</sup>; se ha descrito un aumento de la expresión de ambas en tumores resistentes y en aquellos con baja actividad proliferativa<sup>23</sup>.

### *Alteraciones de la diana molecular*

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 fármacos. La resistencia ligada a estas enzimas se ha estudiado ampliamente a escala experimental<sup>1,19,24</sup>. Algunos autores la denominan resistencia *atípica* a múltiples fármacos<sup>25</sup>, ya que consideran *típica* o *clásica* la relacionada con la proteína Pgp. Las topoisomerasas son enzimas muy importantes en el metabolismo del ADN. Entre otras funciones, rompen de forma controlada y posteriormente vuelven a unir las cadenas de nucleótidos<sup>24</sup>. Existen 2 tipos de topoisomerasas: la I y la II. La I rompe una sola cadena, mientras que la II lo hace con ambas cadenas a la vez. Las roturas del ADN permiten el paso de una cadena a través de la otra, lo que es imprescindible para la formación de la doble hélice. Las alteraciones cuantitativas o cualitativas de la enzima pueden alterar su sensibilidad a sus inhibidores. Existen 2 isoformas de la topoisomerasa II, llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ <sup>26</sup>. Estas isoformas presentan una regulación diferente, y sus propiedades y, probablemente, sus funciones también lo son. Los fármacos inhibidores de las topoisomerasas se unen de forma fija a ellas y al ADN, y estabilizan las roturas de éste. Al impedirse el restablecimiento de la integridad del ADN se inicia el proceso de la muerte celular<sup>19,27</sup>. Son inhibidores de la topoisomerasa I fármacos como el topotecán y el irinotecán o CPT11. Son inhibidores de la topoisomerasa II las epidodofilotoxinas, como el VP16, o etopósido, y el VM26, o tenipósido, las antraciclinas y otros fármacos, como la mitoxantrona y la dactinomicina. Varios de estos fármacos se emplean en el tratamiento del cáncer de pulmón<sup>8,9</sup>.

Se ha publicado, que los valores de topoisomerasa II $\alpha$  en carcinomas escamosos, adenocarcinomas y carcinomas de célula grande de pulmón son menores que en los carcinomas de célula pequeña, lo que podría contribuir a su diferente sensibilidad a la quimioterapia<sup>23</sup>. Las alteraciones de la topoisomerasa II $\alpha$  pueden desempeñar un papel en la resistencia a la quimioterapia del cáncer de pulmón<sup>6,25</sup>, pero los estudios clínicos, en general, no encuentran relación con la respuesta a la quimioterapia ni con otras variables clínicas<sup>22,25,28,29</sup>. Sin embargo, algunos estudios han detectado una peor supervivencia en los pacientes que presentan valores altos de topoisomerasa II $\alpha$ <sup>28,29</sup>.

#### *Factores que evitan la muerte celular*

La célula tumoral puede defenderse de los efectos de la quimioterapia, incluso después de que el medicamento haya alcanzado su objetivo y causado un daño importante<sup>11</sup>. Dos alteraciones celulares destacan en este ámbito: un aumento en la capacidad de reparación del ADN y, lo que parece más importante, el fallo en la muerte celular programada o apoptosis.

#### *Aumento en la capacidad de reparación del ADN*

Muchos citotóxicos tienen en común la alteración de la estructura del ADN (alquilantes, inhibidores de la topoi-

merasa, antimetabolitos)<sup>19</sup>. El aumento de la capacidad de reparación de éste es otro mecanismo causante de resistencia múltiple. Anormalidades en enzimas como la O6-alquilguanina-alquiltransferasa (ATasa), o alteraciones en los genes que reparan la escisión del ADN, parecen estar entre sus causas<sup>11,19</sup>. Recientemente, se ha detectado que una elevada expresión de gen *ERCC1* (*excision repair cross-complementing 1*) aumenta la resistencia al cisplatino en el cáncer de pulmón<sup>30</sup>.

### Fallo de la muerte celular programada o apoptosis

Es uno de los factores a los que se le da actualmente más importancia como causa de resistencia a múltiples fármacos. Los tejidos normales, a diferencia de los neoplásicos, no crean resistencia a la quimioterapia<sup>2</sup>. Esto es evidente con la simple observación clínica. Los tejidos normales más renovables, como la mucosa gastrointestinal y la médula ósea, aun siendo los que más sufren los efectos de los fármacos antineoplásicos, nunca se vuelven resistentes, y a pesar del uso reiterado del fármaco continúan sufriendo sus efectos tóxicos<sup>2</sup>. Hoy día, se cree que esto se debe a que los tejidos normales tienen intacta y en buen funcionamiento toda la maquinaria genética que controla los llamados "puntos de chequeo" del ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis. Estos controles, no permiten que células con ADN dañado entren en división, de tal manera que detienen el ciclo celular hasta que se repare el ADN o bien encaminan a la célula hacia la muerte programada o apoptosis. No se conoce el motivo por el cual una célula con su ADN dañado opta por iniciar la apoptosis o por parar el ciclo celular y reparar dicho daño<sup>18</sup>. La alteración de estos sistemas de control del crecimiento celular puede ser una de las causas principales de la resistencia a la quimioterapia<sup>2</sup>. De hecho, se han iniciado estudios con sustancias que inducen apoptosis<sup>31</sup>. El mal funcionamiento de los mecanismos de control del ciclo celular y de la apoptosis provoca que una célula con daño no reparado en su ADN se reproduzca continuamente, en lugar de morir o detener su duplicación<sup>2,18</sup>.

Los nuevos conocimientos sobre el control del ciclo celular modifican la visión clásica de que la sensibilidad a los fármacos antineoplásicos depende, de forma casi exclusiva, de la interacción entre el fármaco y su diana celular. En muchas ocasiones dicha interacción es sólo el estímulo que inicia una cascada de acontecimientos que eventualmente pueden terminar con la vida de la célula<sup>2</sup>. Un elemento importante en todo lo descrito anteriormente es la proteína p53. La p53 es una proteína activadora de la transcripción, con efecto tumoral supresor, que actúa deteniendo el ciclo celular en la fase G1 o G2, cuando la célula es expuesta a fármacos que dañan el ADN<sup>2,32</sup>. Por otro lado, también es una potente inductora de la apoptosis<sup>32</sup>. Las mutaciones en el gen que codifica la p53 son frecuentes en los tumores humanos<sup>2</sup>. Las alteraciones en la regulación de la apoptosis y en los puntos de chequeo del ciclo celular, por mutaciones de la p53, pueden ser causa de resistencia a la quimioterapia<sup>2,33</sup>. Una p53 alterada se ha relacionado con la resistencia a una gran variedad de quimioterápicos, pero, por el con-

trario, también con una mayor sensibilidad a otros<sup>2</sup>. Las alteraciones de la p53 se han relacionado con la respuesta a la quimioterapia<sup>34-36</sup>, con la resistencia al cisplatino y con las metástasis ganglionares. Por el contrario, otros estudios no han encontrado significación pronóstica<sup>37,38</sup> ni influencia en la falta de respuesta al cisplatino<sup>39</sup>.

La p53, en su estado normal, parece ejercer un efecto supresor sobre los genes que codifican 2 proteínas relacionadas con la resistencia a la quimioterapia, Mrp y Pgp<sup>34,40</sup>. La Pgp, con independencia de su papel de bomba de membrana se ha relacionado con la inhibición de la apoptosis por vías diferentes a la p53<sup>41</sup>.

Además de la p53, existen otros elementos que, actuando también sobre la apoptosis, pueden tener un papel en la resistencia a la quimioterapia<sup>2</sup>. Entre ellos se encuentran: la activación de genes supresores de la apoptosis, como el *Bcl-2*, cuya inhibición disminuye la resistencia a fármacos antineoplásicos en cultivos celulares de leucemia y linfomas; la inhibición de las proteincinasas activadas por el estrés (*stress-activated protein kinase* [SAPK]), las cuales facilitan la apoptosis inducida por quimioterapia, o la inhibición de las caspasas, que activadas por muchos quimioterápicos inician la apoptosis<sup>42</sup>.

### El fenómeno de la resistencia a múltiples fármacos

La práctica clínica diaria pone en evidencia que la mayoría de tumores sólidos, de forma innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples quimioterápicos, con estructura y mecanismos de acción muy diferentes. Este resultado final es similar a un fenómeno descrito experimentalmente y que recibe el nombre de resistencia a múltiples fármacos (MDR, *multidrug resistance*). En su descripción inicial, este fenómeno se relacionó con una proteína transportadora de la membrana celular llamada Pgp, pero posteriormente se descubrieron otros mecanismos causantes del fenotipo celular multirresistente, como los ligados a otras proteínas transportadoras, a las alteraciones de enzimas, como las topoisomerasas, o a sistemas detoxificantes, como el del glutatión (GSH)<sup>10,11,13,15-17,43</sup>.

### Proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas)

La historia de las proteínas causantes de resistencia a múltiples fármacos o MDR-proteínas, se inicia en 1973, cuando Dano<sup>44</sup> descubre la expulsión activa de daunomicina en células tumorales resistentes. Estas células habían sido expuestas únicamente a este fármaco, pero presentaban resistencia cruzada con la doxorubicina y los alcaloides de la vinca. Posteriores estudios describieron el fenotipo celular resistente a múltiples fármacos o fenotipo MDR, que consistía en que células seleccionadas para resistencia, mediante la exposición a un único agente antineoplásico, desarrollaban resistencia a una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína en la membrana plasmática de células multirresistentes que, por sus características, parecía una buena candidata a

ser una bomba de expulsión<sup>45</sup>. Pero fue en 1983, cuando Victor Ling y otros investigadores dieron a conocer que el aumento de la expresión de esa proteína de 170 kDa, llamada Pgp, estaba implicado en la resistencia a múltiples fármacos en líneas celulares de mamíferos<sup>46</sup>.

Aunque los fármacos afectados por las MDR-proteínas presentan diferencias en su estructura y mecanismo de acción, tienen características comunes, como ser compuestos de origen natural, lipofílicos y con un peso molecular de entre 300 y 900 Da, que entran en la célula por difusión pasiva. Estas proteínas se encuentran presentes en numerosos tejidos normales del organismo humano y en los tumores que de ellos se derivan. El hecho de que muchos de estos tejidos tengan funciones secretoras-excretoras (riñón, hígado, epitelio digestivo y respiratorio) hace pensar que las MDR-proteínas podrían desempeñar funciones fisiológicas de protección ante toxinas exógenas<sup>47,48-50</sup>. Esto último podría explicar el aumento de expresión de algunas de estas proteínas detectado en fumadores<sup>51</sup>.

A escala experimental, las MDR-proteínas producen resistencia fundamentalmente de 3 formas:

- Pgp, Mrp y Bcrp se localizan en la membrana celular y pertenecen a una familia de transportadores conocidos como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Los miembros de esta familia están implicados en el transporte activo de numerosas moléculas a través de la membrana celular. Pgp, Mrp y Bcrp actúan como "bombas de expulsión", y disminuyen la acumulación intracelular de varias sustancias, incluidos numerosos citostáticos<sup>13,43</sup>.
- Fundamentalmente, la Lrp, pero también la Mrp y la Pgp, se han asociado con la alteración de la distribución intracelular de algunos fármacos<sup>52,53</sup>.
- La Pgp parece influir de forma directa sobre la apoptosis<sup>41,54</sup>.

#### *Pgp (P-glucoproteína)*

La resistencia ligada a Pgp, por ser ésta la primera MDR-proteína descubierta, es el mecanismo de resistencia a múltiples fármacos estudiado más extensamente. Por ello, se conoce también como MDR clásica o típica<sup>25</sup>. Al gen que codifica la Pgp se denomina *MDR1*, y se localiza en el cromosoma 7. Existe, en humanos, otro gen homólogo conocido como *MDR3*<sup>55</sup>. Recientemente, se ha descubierto que el producto de este gen, una proteína idéntica en un 77% a la Pgp, es esencial para la excreción de fosfatidilcolina en la bilis, y que su ausencia produce la colostasis intrahepática familiar progresiva tipo 3<sup>56</sup>. Dicha proteína no se encuentra en el tejido pulmonar y se desconoce si contribuye al fenómeno de la resistencia a múltiples fármacos<sup>57</sup>.

La Pgp es una glucoproteína de membrana con un peso molecular de 170 kDa; por este motivo, se denomina también proteína P-170<sup>15</sup>. La Pgp actúa como una bomba de expulsión ATP-dependiente, y reduce la acumulación intracelular de varias sustancias. Se expresa normalmente en el colon, el intestino delgado, las suprarrenales, el riñón y el hígado, y se piensa que su función

puede ser aumentar la excreción y limitar la absorción de elementos nocivos para el organismo. Se han detectado valores elevados de Pgp en el endotelio capilar del cerebro y los testes, así como en la barrera placentaria<sup>17,48</sup>, el músculo, el pulmón y el páncreas<sup>58</sup>.

La expresión de Pgp determina un fenotipo celular resistente a varios productos naturales, como antraciclinas, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas y taxanos, entre otros. También sirven de sustrato a la Pgp otros fármacos o compuestos exógenos, como los bloqueadores de los canales del calcio (verapamilo), la digoxina, los opiáceos, los hidrocarburos aromáticos, los complejos sintéticos, como el <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, la rodamina-123 o antivirales como los inhibidores de la proteasa<sup>15,17</sup>.

Se ha detectado la Pgp en varias neoplasias hematológicas y sólidas<sup>59</sup>, y puede aparecer *de novo* o ser inducida por el tratamiento con quimio, hormono<sup>60</sup> o radioterapia<sup>61</sup>.

#### *Mrp (multidrug resistance-associated protein)*

La Mrp es, en realidad, una familia de varios transportadores celulares<sup>21</sup>. Las Mrp se localizan en la membrana plasmática, y forman parte, como la Pgp, de los transportadores ABC, pero también en el retículo endoplasmático, de lo que se infiere que pueden actuar tanto en la expulsión de fármacos fuera de la célula como en el secuestro intracelular de éstas en las vesículas citoplasmáticas<sup>17</sup>. Las Mrp son capaces de transportar aniones orgánicos y fármacos neutros, conjugados o no, con sustancias como el glutatión, los glucoronatos y los sulfatos. Se cree que algunos sistemas de expulsión de conjugados de glutatión (*GS-X pumps*) pueden ser proteínas de la familia Mrp<sup>62</sup>; tal es el caso de los *GS-X pumps* que expulsan metotrexato (anión orgánico), que se han relacionado con Mrp1, Mrp2 y Mrp3<sup>21,63</sup>. 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<sup>8,9</sup>.

*Mrp1*. Ha sido la más estudiada del grupo. Es una proteína de 190 kDa codificada por el gen *MRP1* que se localiza en el cromosoma 16. Fue descubierta por Cole et al a partir de una línea celular de cáncer de pulmón multirresistente (H69AR) que no expresaba Pgp<sup>47</sup>. La mayoría de trabajos que hacen referencia a Mrp, sin especificar su tipo, se refieren a Mrp1. Su espectro de resistencia es similar pero no idéntico al de Pgp, y la ciclosporina A no puede revertirla<sup>50,64</sup>. El transporte de taxanos por Mrp1 es mucho menor que por Pgp, y su afinidad para aniones orgánicos es mucho mayor<sup>21</sup>. Aunque algunos autores niegan su relación con la resistencia al cisplatino<sup>21</sup>, otros sí la relacionan con la falta de respuesta a este fármaco<sup>65</sup>.

La distribución de Mrp1 en tejidos normales es bastante similar a la de Pgp<sup>58</sup>, pero Mrp1 se expresa de forma más importante en el tejido pulmonar normal y, al contrario que la Pgp, se expresa poco en el riñón<sup>47,66</sup> y nada en el hígado<sup>21</sup>. También se encuentra en el tiroides y la próstata<sup>58</sup>. Se han detectado valores elevados de Mrp1 en cé-

lulas mononucleares periféricas, macrófagos alveolares<sup>57</sup> y linfocitos infiltrantes de tumores<sup>66</sup>. La Mrp1 es el mayor transportador de leucotrieno C4<sup>67</sup>. Los leucotrienos son unos potentes mediadores proinflamatorios que aparecen en la fase tardía de la reactividad asmática<sup>67</sup>. Esto y su detección, junto con la Pgp en el interior de las células dendríticas, hacen suponer que ambas desempeñan un papel importante en la respuesta inmune<sup>23</sup>.

La localización celular de Mrp1 difiere de la de la Pgp: mientras que ésta se localiza en la membrana apical del epitelio, la Mrp1 lo hace en la membrana basolateral, por lo que se supone que expulsa sus sustratos a un compartimiento diferente que la Pgp, el intersticio. Esto puede significar un factor de protección importante, por ejemplo, para las células germinales en los túbulos testiculares, o para prevenir la entrada de tóxicos en el líquido cefalorraquídeo a través de los plexos coroides<sup>21</sup>.

**Mrp2.** Es la principal responsable del transporte de bilirrubina hacia los canalículos biliares, su defecto produce el llamado síndrome de Dubin-Johnson. En cultivos celulares, su espectro de resistencia es similar al de la Mrp1, pero con una importante diferencia: la Mrp2 induce resistencia al cisplatino al eliminarlo de la célula conjugado con glutatión (GSH), cosa nunca vista en células que expresan Mrp1. Junto con el clásico fármaco implicado en la MDR, también se ha detectado resistencia al irinotecán y la mitoxantrona<sup>21</sup>. Al igual que para la Mrp1, la presencia de glutatión parece necesaria para la actuación de la Mrp2, ya sea mediante conjugación con ésta, como del cisplatino, o bien de forma no conjugada, como con las antraciclinas y los alcaloides de la vinca<sup>21</sup>.

**Mrp3.** La función fisiológica de la Mrp3 no se conoce: se expresa en la membrana basolateral de los hepatocitos y también en la corteza suprarrenal<sup>21</sup>. Al igual que la Mrp1, parece conferir una fuerte resistencia a la doxorubicina, en líneas celulares del cáncer de pulmón, y en menor grado también se relaciona con resistencia a la vincristina, el etopósido y el cisplatino<sup>65,68</sup>, y con la exposición corta al metotrexato<sup>21</sup>. Se cree que la Mrp3 y la Mrp1 (y en cambio no la Mrp2) pueden ser causa de resistencia a múltiples fármacos en el cáncer de pulmón, y que particularmente la Mrp3 contribuye a la resistencia intrínseca del cáncer de pulmón de célula no pequeña a la quimioterapia<sup>68</sup>. Se ha detectado la expresión significativa de Mrp3 en el tejido pulmonar normal y tumoral de pacientes tratados con cisplatino. También se ha encontrado un rápido aumento de la expresión en células mononucleares periféricas, en las primeras 24 h tras la administración de carboplatino, en pacientes con cáncer de pulmón sin tratamiento quimioterápico previo<sup>69</sup>.

**Mrp4.** Su aumento se asocia a la resistencia a compuestos antivirales contra el VIH (PMEA o AZTMP); por esta resistencia a los análogos de los nucleótidos, se cree que puede desempeñar un papel en la resistencia a antineoplásicos como la 6-mercaptopurina o la tioguanina<sup>21</sup>. No existen pruebas que confirmen la sospecha de la participación de estas proteínas en la resistencia a la quimioterapia de muchos tumores<sup>65</sup>. Su función fisiológica es desconocida<sup>21</sup>.

**Mrp5.** Esta proteína transporta conjugados de glutatión y parece, al igual que la Mrp4, ser una bomba de expulsión de nucleótidos. Se desconoce su función fisiológica<sup>21</sup>.

**Mrp6.** Su fisiología y papel en resistencia son desconocidos. Se detectan valores elevados en el hígado y el riñón, y parece que suele expresarse junto con la Mrp1<sup>21</sup>.

### *Lrp* (lung resistance-related protein)

La Lrp es una proteína de 110 kDa descubierta a partir de una línea celular de cáncer de pulmón con MDR no ligada a la Pgp<sup>70</sup>. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 16, cercano al de la Mrp<sup>71</sup>.

La Lrp aparece como un episodio precoz en la selección de células multirresistentes. En líneas celulares seleccionadas para resistencia a numerosos fármacos se demostró expresión de Lrp cuando los valores de resistencia eran bajos. La expresión de Lrp declinaba con valores mayores de resistencia, a la vez que aumentaba la expresión de Pgp<sup>72</sup>.

Se conoce también como MVP (*major vault protein*), porque constituye el componente proteínico mayor de unas organelas celulares llamadas *vaults*<sup>53</sup>. Los *vaults*—de descripción relativamente reciente<sup>73</sup>—son ribonucleoproteínas con una compleja estructura en forma de barril. Los *vaults* tienen una composición y una estructura casi idénticas en especies filogenéticamente tan alejadas como las amebas y los humanos, lo que parece indicar que su función es esencial para las células eucariotas. La mayoría de los *vaults* se encuentran en el citoplasma, probablemente en asociación con vesículas citoplasmáticas, y una pequeña parte en la membrana nuclear, concretamente en los complejos porosos nucleares o NPC (*nuclear pore complex*). Se dispone de pruebas de que los *vaults* son en realidad las unidades transportadoras de los NPC, y están implicados en el transporte bidireccional entre el núcleo y el citoplasma de una gran variedad de sustratos<sup>73</sup>.

No se conoce exactamente cómo la Lrp puede afectar a la quimioterapia, aunque se especula acerca de una probable regulación del transporte de fármacos entre el núcleo y el citoplasma, y entre éste y el interior de vesículas citoplasmáticas<sup>70</sup>. La transferencia del gen de la Lrp sola no es suficiente para conferir resistencia a fármacos<sup>53</sup>, y es posible que para esto se necesite el *vault* completo.

Se ha detectado Lrp en el riñón, la glándula suprarrenal, el corazón, el músculo, el tiroides, la próstata, la médula ósea y los testículos<sup>58</sup>. La Lrp se expresa más intensamente en células bronquiales, queratinocitos y macrófagos que la Pgp y menos en los canalículos biliares. En los pulmones se expresa de forma más intensa en los macrófagos alveolares que en las células epiteliales<sup>74</sup>. En tejidos tumorales, su expresión parece guardar una relación inversa con la quimiosensibilidad de éstos<sup>75</sup>.

La expresión de Lrp se relaciona *in vitro* con un espectro de resistencia múltiple, que incluye fármacos de los considerados “clásicos” en MDR, y otras que no, como el melfalán y las sales de platino<sup>33,76</sup>. La expresión de Lrp

parece aumentar en situaciones de hipoxia<sup>12</sup>. Se ha demostrado, de forma clara, la implicación de Lrp en la resistencia a la adriamicina, la vincristina, el Vp16 y el taxol, y en el transporte de adriamicina, entre el núcleo y el citoplasma, en la línea celular de carcinoma de colon humano SW-620<sup>52</sup>. En líneas celulares no seleccionadas de cáncer de pulmón de célula no pequeña, se ha encontrado una correlación entre la Lrp y la resistencia al cisplatino, y por mecanismos diferentes a otras formas de resistencia a este fármaco, como pueden ser los sistemas de expulsión de conjugados con el glutatión (*GS-X pumps*).

#### *Brcp* (breast cancer resistance protein)

La Brcp es la MDR-proteína de descubrimiento más reciente; se aisló en líneas celulares multirresistentes seleccionadas por exposición a la mitoxantrona. También se denomina MXP, ABCP o ABCG2<sup>77-79</sup>. La Brcp es un "medio-transportador" ABC, que necesita estar en forma de dímero o multímero para trasladar sustratos de forma eficiente a través de la membrana celular. Su expresión confiere una elevada resistencia a las antraciclinas (mitoxantrona<sup>80</sup>, daunorrubicina, doxorrubicina) y a los inhibidores de la topoisomerasa I; de hecho, es un eficiente transportador de topotecán<sup>81</sup>, pero no parece afectar a los taxanos, a los alcaloides de la vinca ni al cisplatino<sup>17,81</sup>. La Brcp presenta una baja expresión en el tejido pulmonar, y se localiza fundamentalmente en la capa epitelial, las glándulas seromucinosas y el endotelio capilar<sup>57</sup>. Se ha detectado expresión de Brcp en leucemias agudas<sup>82</sup> y en algunos tumores sólidos, como el cáncer de pulmón<sup>83</sup>. Se dispone de muy pocos datos sobre el significado clínico de esta nueva MDR-proteína. Por inmunohistoquímica, la Brcp está presente en vasos y en el epitelio mamario normal, pero no en las células tumorales de pacientes con neoplasia de mama, y sin diferencias de expresión entre las pacientes expuestas o no a las antraciclinas. Por métodos más sensibles (transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa [RT-PCR]), la expresión fue muy variable y sin relación con la respuesta ni la supervivencia<sup>84</sup>.

### Técnicas de estudio de MDR-proteínas

#### *Determinación de expresión*

El método ideal para medir los valores de las MDR-proteínas debería ser sensible, reproducible, aplicable a pequeñas muestras titulares y capaz de distinguir entre células tumorales y no malignas que infiltren el tumor<sup>85,86</sup>. Por desgracia, ninguno de los métodos actualmente disponibles cumple al completo estos requisitos. La variedad de técnicas, junto con la falta de uniformidad entre los autores en la forma de medir y cuantificar la expresión de las MDR-proteínas, hace muy difícil la comparación entre los diferentes estudios<sup>87</sup>.

Los diferentes métodos para estudiar las MDR-proteínas van desde la búsqueda del gen que las codifica, hasta la detección de la propia proteína<sup>85,87,88</sup>. Entre unos y otros existen importantes variaciones de sensibilidad y especificidad.

Entre los que detectan el gen, se incluyen técnicas de ARN mensajero (ARNm) como la RT-PCR, el Northern blot, el Slot blot, el *RNAse protection assay* y la hibridación *in situ*. Entre los que detectan la proteína, se encuentran la inmunohistoquímica, la técnica de Western blot o la citometría de flujo. Esta última es de utilidad y de más fácil empleo en neoplasias hematológicas, pero precisa contar con un anticuerpo que se una a un epítipo extracelular de la MDR-proteína. Con citometría de flujo se ha podido determinar la expresión de Pgp en diferentes subtipos celulares<sup>89</sup>. En general, las técnicas más utilizadas en tumores sólidos son la RT-PCR y la inmunohistoquímica.

**RT-PCR.** Es una prueba cuantitativa muy sensible<sup>90</sup>, pero puede dar falsos positivos al amplificar ARNm de células normales que expresen el gen, de modo que sólo pueden considerarse muy fiables los resultados negativos<sup>87</sup>. Este hecho puede dificultar la interpretación de los resultados obtenidos en algunos estudios, como por ejemplo en los de cáncer de pulmón, ya que se ha detectado expresión de MDR-proteínas en los tejidos normales adyacentes al tumor<sup>74</sup>, y también en células no neoplásicas que lo infiltran<sup>91</sup>.

**Inmunohistoquímica.** Es menos sensible que la RT-PCR, pero más fácilmente aplicable en la clínica, por lo que se considera el método de elección en tumores sólidos<sup>92</sup>. Se trata de una técnica relativamente sencilla, que en teoría puede detectar estas proteínas incluso en una sola célula. Esto permite trabajar con pequeñas muestras tisulares, como biopsias broncoscópicas. Además, tiene la capacidad de diferenciar entre células normales y tumorales<sup>15,87,88</sup>. La especificidad del anticuerpo utilizado y el material de conservación de las muestras pueden influir en la validez del resultado. Por ejemplo, el anticuerpo C-219, usado para detectar la Pgp, reacciona también con el producto del gen *Mdr2*. Este gen es muy parecido secuencialmente al *Mdr1*, pero de función desconocida<sup>93</sup>, lo que puede alterar los resultados y explicar la tinción de los linfocitos con este anticuerpo. Aunque se están mejorando las técnicas para muestras conservadas en parafina, la reactividad es menor que en el tejido congelado<sup>23,57</sup>. Otros inconvenientes de la inmunohistoquímica son los diferentes criterios para considerar que una muestra es positiva y la importante variación interobservador. En un estudio, donde se analizó este último aspecto, se detectaron discordancias en el 26% de los casos evaluados<sup>94</sup>.

Si es posible, parece recomendable el uso de los 2 métodos: RT-PCR por sensibilidad y cuantificación, e inmunohistoquímica para la localización<sup>92</sup>. Pero el tamaño de la muestra o su modo de conservación pueden dificultar o impedir la realización de más de una técnica. Algunos autores han encontrado resultados similares al emplear estas 2 técnicas simultáneamente en pacientes con cáncer de pulmón<sup>95</sup>.

#### *Determinación de función*

La detección de una proteína o de su gen no implica necesariamente funcionalidad, pues fenómenos de fosfo-

rilación o mutaciones pueden alterar su actividad. A pesar de ello, un gran número de estudios básicos soporta la impresión de que el aumento de la cantidad de una proteína implica un aumento de su función<sup>23</sup>.

La determinación de la funcionalidad de la Pgp se considera una prueba muy importante en las neoplasias hematológicas. Para ello se han empleado pruebas de fluorescencia con buenos sustratos como la rodamina-123 o la calceína, combinados con moduladores específicos. En concreto, la captación de la rodamina-123 de los linfocitos CD56<sup>+</sup> circulantes se utiliza para valorar las modificaciones funcionales de la Pgp en los pacientes incluidos en estudios de modulación<sup>96</sup>. Estas pruebas de funcionalidad se han relacionado con resistencia a la quimioterapia y otros factores pronósticos en este tipo de neoplasias<sup>33</sup>.

El hecho de que algunas sustancias radiofarmacéuticas de carácter lipofílico, como el tecnecio-99m tetrofosmin (Tc-TF) o el tecnecio-99m sestamibi (<sup>99m</sup>Tc-MIBI), sean sustrato de algunas MDR-proteínas<sup>97</sup> ha permitido efectuar estudios de imagen sobre su funcionalidad *in vivo* en tumores sólidos. Que esto pueda ser útil para planificar el tratamiento de los pacientes con cáncer está por demostrar. Se ha descrito una buena correlación entre la expresión de Pgp y la acumulación intratumoral de estas sustancias en el cáncer de mama<sup>98</sup>. En cambio, esta correlación no parece encontrarse en osteosarcomas<sup>99</sup>. Con respecto al cáncer de pulmón, varios estudios han detectado una relación significativa entre la expresión de MDR-proteínas y la acumulación y/o la disminución del aclaramiento intratumoral de estas sustancias. Se han publicado resultados positivos, fundamentalmente en Pgp, con una relación inversa entre su expresión y los diferentes parámetros de captación tumoral de los compuestos de tecnecio<sup>100-102</sup>. Estudios de expresión conjunta de varias MDR-proteínas han dado resultados discrepantes. Mientras que algunos han encontrado que una captación positiva de <sup>99m</sup>Tc-MIBI se corresponde con una buena respuesta a la quimioterapia y una baja expresión de Pgp y Mrp1, en pacientes con carcinomas de célula pequeña<sup>101,103,104</sup>, otros confirman la relación con la expresión de Pgp, pero no con la de Mrp1<sup>102</sup>. Por el contrario, hay autores que no detectan relación entre la respuesta a la quimioterapia y la captación de Tc-TF en ningún tipo de cáncer de pulmón<sup>105</sup>, ni tampoco entre la captación de <sup>99m</sup>Tc-MIBI y la expresión de Pgp y Mrp1, en el cáncer de pulmón de célula no pequeña<sup>106</sup>. En lo que sí parece haber acuerdo es en la falta de relación con la expresión de Lrp<sup>102,107</sup>.

### Inhibición o modulación clínica de las MDR-proteínas

Las esperanzas concebidas tras el descubrimiento de la Pgp recibieron un gran empuje cuando Tsuruo et al, en 1981, publicaron que el verapamilo podía revertir el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Poco después, se descubrió que varios compuestos de uso clínico eran capaces de inhibir a la Pgp en el laboratorio. Estos compuestos actuaban fundamentalmente inhibiendo el bombeo del fármaco hacia el exterior de la célula, lo que aumentaba su concentración intracelular. Desde entonces, saturar o mo-

dular la función de la Pgp ha sido, y es, una estrategia para intentar modificar la MDR ligada a esta proteína<sup>15,96,108</sup>.

### Primera generación de inhibidores

Junto con el verapamilo, la primera generación de inhibidores incluía la quinidina, la amiodarona, la nicardipina, el nifedipino, la quinina, el tamoxifeno y la ciclosporina A. Muchos de ellos tienen características químicas comunes, son inhibidores competitivos y todos son altamente lipofílicos<sup>99</sup>. Una vez conocida la capacidad de estas sustancias para inhibir la Pgp, se iniciaron ensayos clínicos con la intención de revertir la resistencia a la quimioterapia<sup>108</sup>. Estos primeros estudios se realizaron con diferentes regímenes de quimioterapia y en diferentes tumores. Sus resultados no encontraron que la inhibición de la Pgp fuera importante para el tratamiento del cáncer, pero estos estudios tenían importantes defectos. No estaba claramente establecido que los pacientes fueran resistentes a la quimioterapia empleada, ni cuál era el valor de la Pgp como mediador de resistencia en los tumores estudiados. El inhibidor utilizado carecía de potencia inhibidora a las concentraciones alcanzadas en el suero o, incluso, no tenía eficacia inhibidora comprobada<sup>108</sup>. Cuando se intentaban conseguir *in vivo* las concentraciones efectivas *in vitro*, la toxicidad era muy importante, y al intentar disminuirla, se utilizaban concentraciones subóptimas<sup>109</sup>. Hay que tener en cuenta que, *in vitro*, los valores de expresión de Pgp en células resistentes son de alrededor de 400-1000 veces el de las células sensibles, mientras que en la clínica, éstos son de alrededor de 10 veces<sup>108</sup>. Por otro lado, los inhibidores pueden originar un importante aumento de la toxicidad por interacciones farmacocinéticas impredecibles con la quimioterapia, ya que pueden bloquear la función de la Pgp en los tejidos normales, y muchos son sustratos para otros transportadores y sistemas enzimáticos<sup>96,108</sup>. Un efecto directo sería el aumento de la mielosupresión, al bloquear la función destoxicante de la Pgp en las células precursoras de la hematopoyesis. Uno indirecto sería alterar la eliminación del fármaco por bloqueo de la Pgp en el riñón y los canales biliares<sup>99</sup>. Por ello, muchos estudios eran, en realidad, trabajos de escalada de dosis de la quimioterapia empleada. Este problema se intentó solucionar disminuyendo la dosis de quimioterapia, para que la toxicidad de la combinación con agentes moduladores fuera igual que con la quimioterapia sola<sup>99</sup>, pero las variaciones individuales hicieron impredecible el resultado de estas interacciones farmacológicas, lo que condujo a una infra o sobredosificación en numerosos pacientes<sup>96,108</sup>.

Se han publicado algunos resultados positivos con verapamilo en el mieloma múltiple<sup>110</sup>, no confirmados posteriormente en un estudio aleatorizado<sup>111</sup>. Otros estudios aleatorizados, usando quinina en síndrome mielodisplásico<sup>112</sup>, ciclosporina en leucemia mieloide aguda y un pequeño estudio con verapamilo en el cáncer de pulmón de célula no pequeña han resultado positivos, mientras que otro en cáncer de pulmón de célula pequeña no demostró ningún beneficio.

La cinchonina, un isómero de la quinina, se está probando en síndromes linfoproliferativos avanzados<sup>33</sup>. El di-



sulfirán, empleado desde hace muchos años para el tratamiento del alcoholismo, parece ser también un potente inhibidor de la Pgp<sup>113,114</sup>.

### Segunda generación de inhibidores

Esta nueva generación de moduladores incluye el dexametazona, el dexniguldipino, el PSC 833, o valspodar, y el VX-710, o biricodar. Todos ellos son más potentes y menos tóxicos que sus predecesores<sup>96</sup>. El valspodar, o PSC 833, un análogo de la ciclosporina D, es un inhibidor no competitivo de la Pgp que se une a ésta con gran afinidad, pero no puede ser transportado por ella, su potencia inhibidora es 5-20 veces superior que la de la ciclosporina A. Se considera que el PSC 833 es uno de los más prometedores moduladores, ya que se pueden conseguir valores efectivos en suero en combinación con agentes citotóxicos, sin aumentar la toxicidad<sup>89</sup>. A pesar de ello, se ha producido el cierre prematuro de un estudio en pacientes con leucemia mieloide aguda, al detectarse una elevada mortalidad precoz, en la rama de pacientes que recibían el modulador<sup>115</sup>. En realidad, los inhibidores de segunda generación también alteran el metabolismo y la excreción de los agentes citotóxicos, muy probablemente por competencia con el citocromo P450 3A4, del que también son sustratos, lo que puede condicionar también una inaceptable toxicidad<sup>96,108</sup>. El VX-710, o biricodar, es un derivado pipicolinado actualmente objeto de un extenso estudio. Tiene una alta afinidad por la Pgp, pero también inhibe la Mrp1<sup>116</sup>.

Los estudios clínicos con estos moduladores de segunda generación han tenido un limitado éxito en el tratamiento de algunos tumores refractarios<sup>96,108</sup>.

### Tercera generación de inhibidores

Estos moduladores intentan mejorar las limitaciones de los anteriores. Se trata de potentes y específicos inhibidores de la Pgp que no afectan al citocromo P450 3A4 y tampoco parecen inhibir otros transportadores ABC. En los estudios clínicos realizados no parecen afectar a la farmacocinética de la quimioterapia y no son necesarias las reducciones de dosis. Uno de los más prometedores es el tariquidar (XR9576), un derivado antranilamídico. El tariquidar es un inhibidor no competitivo que parece que se une a la Pgp en la misma zona que el adenosín trifosfato (ATP), e inhibe la actividad ATPasa de ésta. Su actividad es mucho más potente y duradera que la de otros moduladores. En pacientes con tumores sólidos no altera la farmacocinética del paclitaxel, la vinorelbina y la doxorubicina. En la actualidad se realizan estudios fase III con tariquidar en pacientes de NSCLC<sup>96</sup>. Otros inhibidores de tercera generación en estudio son: LY335979, o zosuquidar, un derivado de la quinolona que también parece afectar poco a la quimioterapia<sup>117</sup>, y GG120918, o elacridar, un derivado de la acridonecarboxamida inhibidor de la Pgp capaz de modular también la Bcrp (R101933, o laniquidar, y ONT-093)<sup>96</sup>.

No existe, en la actualidad, posibilidad de revertir la resistencia de Mrp1, ya que no se dispone de inhibidores

específicos. Potentes inhibidores competitivos serían los aniones orgánicos, que son sustratos de alta afinidad para esta proteína, como el leucotrieno C4. Otros inhibidores podrían ser los ácidos orgánicos, como la sulfipirazona o el probenecid. El problema es que la mayoría de estos compuestos aniónicos no entran en la célula y no son buenos como punto de partida para el desarrollo de fármacos moduladores. Los buenos inhibidores deberían partir, probablemente, como profármacos con carga neutra<sup>21</sup>. La ausencia de moduladores específicos hace muy difícil el análisis de la contribución de Mrp1 en la resistencia a la quimioterapia<sup>21</sup>.

No se conoce actualmente ninguna forma de modular *in vitro* o *in vivo* la Lrp<sup>33</sup>.

## MDR-proteínas en tumores sólidos

### Pgp

Se ha detectado expresión de Pgp en numerosos tumores sólidos<sup>59</sup>, que aumenta tras la exposición a la quimioterapia<sup>118,119</sup>. Es frecuente encontrar una elevada expresión de Pgp en pacientes no tratados con cáncer de colon, riñón, hígado, suprarrenales y páncreas, entre otros<sup>59</sup>. Existen datos de que la presencia de Pgp puede condicionar, por sí sola, un mal pronóstico, con independencia de su acción sobre la respuesta a la quimioterapia<sup>120-122</sup>. Es posible que la Pgp pueda transportar factores de crecimiento no identificados que estimulen las células cancerosas, o factores de angiogénesis, desde el interior de la célula al compartimiento extracelular<sup>123</sup>. La relación de Pgp con la respuesta a la quimioterapia y otros parámetros clínicos es aún más controvertida que en las neoplasias hematológicas<sup>59</sup>. Su expresión se ha relacionado con una peor respuesta a la quimioterapia y/o un peor pronóstico en tumores como sarcomas y neuroblastomas infantiles<sup>124,125</sup>, cáncer de mama<sup>60,126</sup>, colon<sup>122</sup>, vejiga<sup>119</sup>, ovario<sup>127</sup>, hepatoblastomas<sup>128</sup>, carcinoma nasofaríngeo<sup>129</sup>, retinoblastoma<sup>130</sup> y osteosarcomas<sup>131,132</sup>. Por el contrario, otros autores no encuentran tal relación en carcinomas gástricos<sup>133</sup>, cáncer renal<sup>134</sup>, de ovario<sup>135,136</sup>, osteosarcomas<sup>137</sup>, de mama<sup>138</sup> y mesoteliomas<sup>139</sup>. Como se puede apreciar, los resultados son contradictorios para algunos tipos de tumor, como los osteosarcomas o el cáncer de mama. En la actualidad, el papel de la Pgp en la resistencia al tratamiento quimioterápico en tumores sólidos está por determinar.

### Mrp1

La Mrp1 se ha detectado en una amplia variedad de neoplasias sólidas. Tal como ocurre con la Pgp, algunos autores han encontrado que puede ser un factor pronóstico independiente en determinados tumores, como los neuroblastomas o el cáncer de mama. También parece tener una mayor expresión en los sarcomas intestinales, paralela a su agresividad clínica, o en el cáncer de próstata, según aumenta el estadio. Por otro lado, se ha relacionado con una peor respuesta a la quimioterapia en el cáncer de vejiga y los retinoblastomas. Para otros tipos

de tumor no se ha detectado una relación significativa con su pronóstico o comportamiento frente a la quimioterapia, como en el caso del cáncer gástrico, renal, ovárico, de cabeza y cuello, y en el mesotelioma. Se ha descrito una expresión de Mrp1 elevada y baja de Pgp en el carcinoma anaplásico de tiroides. Como en el caso de la Pgp, dadas las características de la mayoría de los estudios, no es posible establecer ninguna conclusión firme con respecto a la relación con la resistencia a la quimioterapia.

## Lrp

Su papel con respecto a la resistencia a la quimioterapia en tumores sólidos es desconocido. En algunos estudios en cáncer de ovario avanzado, la expresión de Lrp se ha relacionado significativamente con una peor respuesta a la quimioterapia y la supervivencia, pero en otros no se ha encontrado esta relación, e incluso se ha asociado a características clinicopatológicas favorables como estadio temprano, bajo grado histológico y poco volumen residual tras la cirugía. En el cáncer colorrectal, su expresión es muy frecuente, pero no parece relacionarse con ningún parámetro clínico, salvo una tendencia a una prolongada supervivencia para los pacientes con valores elevados de expresión. En pacientes con sarcomas de parte blandas y melanoma, el tratamiento con melfalan induce un aumento de la expresión de Lrp en la mayoría de los pacientes, sin afectar prácticamente la expresión de Pgp y Mrp1. Su expresión parece aumentar con el estadio en el cáncer de próstata. En el cáncer de mama también presenta una elevada expresión pero, como sucede con las demás MDR-proteínas, con resultados dispares en lo que respecta a su relación con la quimioterapia y otros factores clínicos, de acuerdo con todo lo expuesto, podemos suponer que en un futuro inmediato el papel de la quimioterapia antitumoral en los tumores sólidos estará determinada por la expresión de estas proteínas en el tejido tumoral, que indicarán y seleccionarán a los pacientes teniendo en cuenta la posible utilidad y las posibilidades de la quimioterapia en éstos.

## Bibliografía

- Beck WT, Dalton WS. Mechanisms of drug resistance. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer, principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997. p. 498-512.
- Chu E, DeVita VT. Principles of cancer management: chemotherapy. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer, principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 2001. p. 289-386.
- Skipper HE, Schabel FM, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents XII: on the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. Cancer Chem Rep. 1964;35:1.
- Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. Cancer treat Rep. 1979;63:1727-31.
- Skipper HE, Simpson-Herren L. Relationship between tumor stem cell heterogeneity and responsiveness to chemotherapy. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Important advances in oncology. Philadelphia: JB Lippincott; 1985. p. 63-77.
- Nishio K, Nakamura T, Koh Y, et al. Drug resistance in lung cancer. Curr Opin Oncol. 1999;11:109-15.
- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. Cancer. 1981;47:207-14.
- Carney DN, Shepherd FA. Treatment of SCLC: chemotherapy. En: Hansen HH, editor. Textbook of lung cancer. London: Martin Dunitz; 2000. p. 261-72.
- Shepherd FA, Carney DN. Treatment of NSCLC: chemotherapy. En: Hansen HH, editor. Textbook of lung cancer. London: Martin Dunitz; 2000. p. 213-42.
- Doyle LA. Mechanisms of drug resistance in human lung cancer cells. Semin Oncol. 1993;20:326-37.
- Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. Eur J Cancer. 1996;32A:912-20.
- Koomagi R, Mattern J, Volm M. Glucose-related protein (GRP78) and its relationship to the drug-resistance proteins P170, GST-pi, LRP56 and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. Anticancer Res. 1999;19:4333-6.
- Bradshaw D, Arceci RJ. Clinical Relevance of Transmembrane Drug Efflux as a Mechanism of Multidrug Resistance. J Clin Oncol. 1998;16:3674-90.
- Duchesne MG. Fundamental bases of combined therapy in lung cancer: cell resistance to chemotherapy and radiotherapy. Lung Cancer. 1994;10 Suppl 1:S67-S72.
- Dalton WS. Overcoming the Multidrug-Resistant Phenotype. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer, principles and practice of oncology. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993. p. 2655-66.
- Simon MF, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:3497-504.
- Tan B, Pownall-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. Curr Opin Oncol. 2000;12:450-8.
- Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. Lancet Oncol. 2001;2:33-42.
- Morrow ChS, Cowan KH. Mechanisms of antineoplastic drug resistance. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer, principles and practice of oncology. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993. p. 340-8.
- Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diammine-dichloroplatinum (II). Metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. J Biol Chem. 1993;268:20116-25.
- Borst P, Evers R, Kool M, et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. J Natl Cancer Inst. 2000;92:1295-302.
- 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;64:700-4.
- Kreisholt J, Sorensen M, Jensen PB, et al. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase IIalpha, P-glycoprotein and multidrug resistance protein (MRP) in small-cell and non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. 1998;77:1469-73.
- Plasencia C, Tarón M, Abad A, et al. Genes de quimiorresistencia. En: Rosell R, Abad A, Monzó M, Barnadas A, editores. Manual de oncología clínica y molecular. Madrid: Arán Ediciones; 2000. p. 145-59.
- Scagliotti GV, Novello S, Selvaggi G. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 1999;10 Suppl 5:S83-6.
- Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, et al. Biochemical and Pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. Biochemistry. 1989;28:8154-60.
- Stewart CF, Ratain MJ. Topoisomerase interactive agents. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer, principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 2001. p. 415-31.
- Giaccone G, Van Ark-Otte J, Scagliotti G, et al. Differential expression of DNA topoisomerases in non-small-cell lung cancer and normal lung. Biochim Biophys Acta. 1995;1264:337-46.
- Dingemans AC, Van Ark-Otte J, Span S, et al. Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2001;32:117-28.
- Rosell R, Monzó M, Alberola V, et al. Determinants of response and resistance to cytotoxics. Semin Oncol. 2002;29 Suppl 4:110-8.
- Yang HH, Ma MH, Vescio RA, et al. Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis. J Clin Oncol. 2003;21:4239-47.
- Leonard CJ, Canman CE, Kastan MB. The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Important advances in oncology. Philadelphia: JB Lippincott-Raven; 1995. p. 33.

33. Marie JP. Drug resistance in hematologic malignances. *Curr Opin Oncol.* 2001;13:463-9.
34. Chin KV, Ueda K, Pastan I, et al. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science.* 1992; 2:459-62.
35. Harada T, Ogura S, Yamakazi K, et al. Predictive value of expression of P53, Bcl-2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers. *Cancer Science.* 2003;94:394-9.
36. Kawasaki M, Nakanishi Y, Kuwano K, et al. Immunohistochemically detected p53 and P-glycoprotein predict the response to chemotherapy in lung cancer. *Eur J Cancer.* 1998;34:1352-7.
37. Galimberti S, Marchetti A, Butti F, et al. Multidrug resistance related genes and p53 expression in human non small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 1998;18:2973-6.
38. Schiller JH, Adak S, Feins RH, et al. Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a laboratory ancillary study on an eastern cooperative oncology group prospective randomized trial of postoperative adjuvant therapy. *J Clin Oncol.* 2001;19:448-57.
39. Johnson EA, Klimstra DS, Herndon JE 2<sup>nd</sup>, et al. Aberrant p53 staining does not predict cisplatin resistance in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Invest.* 2002;20:686-92.
40. Wang Q, Beck WT. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res.* 1998;58:5762-9.
41. Smyth M, Krasovskis E, Sutton V, et al. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;95:7024-9.
42. Solary E, Droin N, Bettaieb A, et al. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignances. *Leukemia.* 2000;14:1833-49.
43. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:48-58.
44. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1973;323:466-83.
45. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455:152-62.
46. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science.* 1983;221:1285-8.
47. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992;258:1650-4.
48. Cordon-Cardo C, O'Brian JP. El fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en el cáncer humano. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editores. *Avances en oncología 1991* (ed. esp.). Barcelona: Espaxs; 1992. p. 35-55.
49. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81:116-24.
50. Zaman GJR, Flens MJ, Van Leusden MR, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:8822-6.
51. Koomagi R, Stammer G, Manegold C, et al. Expression of resistance-related proteins in tumoral and peritumoral tissues of patients with lung cancer. *Cancer Lett.* 1996;110:129-36.
52. Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y, et al. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1647-53.
53. Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med.* 1995;1:578-82.
54. Pallis M, Russell N. P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. *Blood.* 2000;95:2897-904.
55. Lincke CR, Smitt JJ, Van der Velde-Koerts T, et al. Structure of the Human MDR3 Gene and Physical Mapping of the Human MDR Locus. *J Biol Chem.* 1991;266:5303-10.
56. De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:282-7.
57. Scheffer GL, Pijnenborg ACLM, Smit EF, et al. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol.* 2002;55:332-9.
58. Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, et al. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett.* 1997;112:23-31.
59. Godstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer.* 1996;32A:1039-50.
60. Trock B, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/Gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:917-31.
61. Ng I, Lam K, Ng M, et al. Expression of P-glycoprotein, a multidrug-resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1998;83:851-7.
62. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, et al. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res.* 1994;54:4833-6.
63. 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;57:5232-7.
64. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, et al. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 1994;54:357-61.
65. Young LC, Campling BG, Voskoulou-Nomikos T, et al. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res.* 1999;5:673-80.
66. Thomas GA, Barrand MA, Stewart S, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human lung tumours and normal tissue as determined by in situ hybridisation. *Eur J Cancer.* 1994;30:1705-9.
67. Busse WW. Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:S210-3.
68. Young LC, Campling BG, Cole SPC, et al. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1798-804.
69. 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;93:584-9.
70. 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;53:1475-9.
71. 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 chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res.* 1995;55:4214-9.
72. 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.
73. Chugani DC, Rome LH, Kedersha NL. Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci.* 1993;106:23-9.
74. Dingemans AMC, Van Ark-Otte J, Van der Valk P, et al. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann Oncol.* 1996;7:625-30.
75. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, et al. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol.* 1996;148:877-87.
76. Izquierdo MA, Shoemaker RH, Flens MJ, et al. Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer cell lines. *Int J Cancer.* 1996;65:230-7.
77. Ikeda K, Oka M, Narasaki F, et al. Lung resistance-related protein gene expression and drug sensitivity in human gastric and lung cancer cells. *Anticancer Res.* 1998;18:3077-80.
78. Allikmets R, Schriml L, Hutchinson A, et al. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998;58:5337-9.
79. Miyake K, Mickley L, Litman T, et al. Molecular cloning of cDNA which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59:8-13.
80. Ross D, Yang W, Abruzzo L, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:429-33.
81. Maliepaard M, Van Gastelen MA, De Jong LA, et al. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* 1999;59:4559-63.

82. Ross DD, Karp JE, Chen TT, et al. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood*. 1999;96:365-8.
83. Kawabata S, Oka M, Soda H, et al. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:3052-7.
84. Faneyte IF, Kristel PM, Maliapaard M, et al. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:1068-74.
85. Broxterman HJ, Lankelma J, Pinedo HM, et al. How to probe clinical tumour samples for P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein. *Eur J Cancer*. 1996;32A:1024-33.
86. Campling BG, Young LC, Baer KA, et al. Expression of the MRP and MDR1 multidrug resistance genes in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1997;3:115-22.
87. Duhem C, Ries F, Dicato M. What does multidrug resistance (MDR) expression mean in the clinic? *The Oncologist*. 1996;1:151-8.
88. Twentyman PR. MDR1 (P-glycoprotein) gene expression. Implications for resistance modifier trials. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84:1458-60.
89. Sonneveld P. Multidrug resistance in hematological malignancies. *J Intern Med*. 2000;247:521-34.
90. Baumforth KNR, Nelson PN, Digby JE, et al. The polymerase chain reaction. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 1999;52:1-10.
91. Giaccone G, Van Ark-Otte J, Rubio GJ, et al. MRP is frequently expressed in human lung-cancer cell lines, in non-small-cell lung cancer and in normal lungs. *Int J Cancer*. 1996;66:760-7.
92. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients tumours: consensus recommendations. *Cancer Res*. 1996;56:3010-20.
93. Scagliotti GV, Michelotto F, Kalikatzaros G, et al. Detection of multidrug resistance associated P-170 glycoprotein in previously untreated non small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 1991;11:2207-10.
94. Wright S, Boag A, Valdimarsson G, et al. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Cancer Res*. 1998;4:2279-89.
95. Xu M, Li J, Xia Q. Expression of multidrug resistance-associated protein gene in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1999;22:268-70.
96. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control*. 2003;10:159-65.
97. Hendrikse NH, Franssen EJ, Van der Graaf WT, et al. <sup>99m</sup>Tc-sestamibi is a substrate for P-glycoprotein and the multidrug resistance associated protein. *Br J Cancer*. 1998;77:353-8.
98. Cayre A, Cachin F, Maublant J, et al. Single static view <sup>99m</sup>Tc-sestamibi scintimammography predicts response to neoadjuvant chemotherapy and is related to MDR expression. *Int J Oncol*. 2002;20:1049-55.
99. Gorlik R, Liao AC, Antonescu C, et al. Lack of correlation of functional scintigraphy with <sup>99m</sup>technetium-methoxyisobutylisonitrile with histological necrosis following induction chemotherapy or measures of P-glycoprotein expression in high-grade osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7:3065-70.
100. Kostakoglu L, Kiratli P, Ruacan S, et al. Association of tumor washout rates and accumulation of technetium-99m-MIBI with expression of P-glycoprotein in lung cancer. *J Nucl Med*. 1998;39:228-34.
101. Kao A, Shiun SC, Hsu NY, et al. Technetium-99m methoxyisobutylisonitrile chest imaging for small cell lung cancer: Relationship to chemotherapy response (six courses of combination of cisplatin and etoposide) and p-glycoprotein or multidrug resistance related protein expression. *Ann Oncol*. 2001;12:1516-66.
102. 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;42:1476-83.
103. Kao CH, Changlai SP, Chieng PU, et al. Technetium-99m Methoxyisobutylisonitrile Chest Imaging of Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer*. 1998;83:64-8.
104. Shiau Y, Tsai S, Wang J, et al. To predict chemotherapy response using technetium-99m tetrofosmin and compare with p-glycoprotein and multidrug resistance related protein-1 expression in patients with untreated small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2001;169:181-8.
105. Dirlik A, Burak Z, Goksel T, et al. The role of Tc-99m sestamibi imaging in predicting clinical response to chemotherapy in lung cancer. *Ann Nucl Med*. 2002;16:103-8.
106. Shi D, Huang G, Miao J, et al. Correlation of the uptake of technetium-99 methoxyisobutyl isonitrile with expression of multidrug resistance genes mdr-1 and MRP in human lung cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2002;82:824-7.
107. Kuo TH, Liu FY, Chuang CY. To predict response chemotherapy using technetium-99m tetrofosmin chest images in patients with untreated small cell lung cancer and compare with p-glycoprotein, multidrug resistance related protein-1, and lung resistance-related protein expression. *Nuclear Med Biol*. 2002;30:627-32.
108. Bates SE, Chen C, Robey R, et al. Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology. *Novartis Foundation Symposium*. 2002;243:83-102.
109. Pennock GD, Dalton WS, Roeske WR, et al. Systemic toxic effects associated with high dose verapamil infusion and chemotherapy administration. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:105-10.
110. Salmon SE, Dalton WS, Grogan TM, et al. Multidrug resistant myeloma: Laboratory and clinical effects of Verapamil as a chemosensitizer. *Blood*. 1991;78:44-50.
111. Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, et al. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. *A South-West Oncology Group study*. *Cancer*. 1995;75:815-20.
112. Wattel E, Solary E, Hecquet B, et al. Quinina improves the results of intensive chemotherapy in myelodysplastic syndromes expressing P-glycoprotein: results of a randomized study. *Br J Haematol*. 1998;102:1015-24.
113. Milroy R. A randomized clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1993;68:813-8.
114. Loo TW, Clarke DM. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:898-902.
115. Baer MR, George SL, Dodge RK, et al. Phase III study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 Years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood*. 2002;100:1224-32.
116. Rowinsky EK, Smith L, Wang YM, et al. Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with bricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP. *J Clin Oncol*. 1998;16:2964-76.
117. Dantzig AH, Law KL, Cao J, et al. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem*. 2001;8:39-50.
118. Petrylack DP, Sher HI, Reuter V, et al. Expresión de P-glicoproteína en el carcinoma de células transicionales de vejiga primario y metastásico. *Ann Oncol (ed. esp.)*. 1995;1:68-74.
119. Tada Y, Wada M, Migata T, et al. Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int J Cancer*. 2002;98:630-5.
120. Charpin C, Vielh P, Duffaud F, et al. Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:1539-45.
121. Levine EA, Holzmayer T, Bacus S, et al. Evaluation of newer prognostic markers for adult soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*. 1997;15:3249-57.
122. Sinicrope FA, Hart J, Brasitus TA, et al. Relationship of P-glycoprotein and carcinoembryonic antigen expression in human colon carcinoma to local invasion, DNA ploidy, and disease relapse. *Cancer*. 1994;74:2908-17.
123. Benchimol S, Ling V. P-glycoprotein and tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:814-6.
124. Chan HSL, Haddad G, Thorner PS, et al. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1991;325:1608-14.
125. Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol*. 1990;8:689-704.
126. Schneider J, González-Roces S, Pollan M, et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of re-excision mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2001;3:183-91.
127. Kamazawa S, Kigawa J, Kanamori Y, et al. Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2002;86:171-6.

128. Warmann S, Hunger M, Teichmann B, et al. The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma: clinical course and in vivo model. *Cancer*. 2002;95:1795-801.
129. Hsu CH, Chen CL, Hong RL, et al. Prognostic value of multidrug resistance 1, glutathione-S-transferase-pi and p53 in advanced nasopharyngeal carcinoma treated with systemic chemotherapy. *Oncology*. 2002;62:305-12.
130. Chan HS, Lu Y, Grogan TM, et al. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res*. 1997;57:2325-30.
131. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, et al. Expression of P-glycoprotein in high grade osteosarcoma in relation to clinical outcome. *N Engl J Med*. 1995;333:1380-5.
132. Cheson BD. Miscellaneous chemotherapeutic agents. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer, principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 2001. p. 452-9.
133. 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;86:1578-85.
134. Oudard S, Levalois C, Andrieu JM, et al. Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome. *Anticancer Res*. 2002;22:121-8.
135. Arts HJG, Katsaros D, De Vries EGE, et al. Drug Resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2798-805.
136. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphate (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer*. 2002;101:488-95.
137. Wunder JS, Bull SB, Aneliunas V, et al. MDR1 gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2000;18:2685-94.
138. Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, et al. Expression of multidrug resistance related transporters in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92:452-8.
139. Soini Y, Järvinen K, Kaarteenaho-Wiik R, et al. The expression of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1 and 2 (MRP1 and MRP2) in human malignant mesothelioma. *Ann Oncol*. 2001;12:1239-45.