

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**"CARACTERIZACION DEL GEN MDR-1 EN PACIENTES
CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA"**

Por

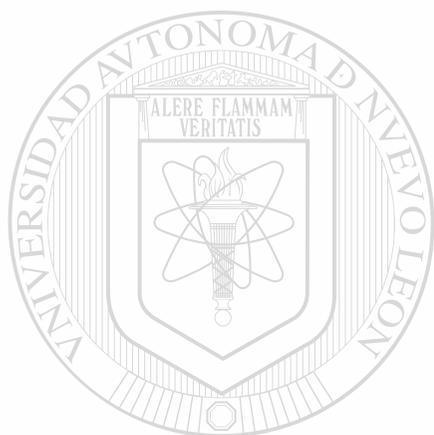
M. en C. SERGIO DOMINGUEZ ARREVILLAGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA
MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Agosto, 2005



1080127600



UANL

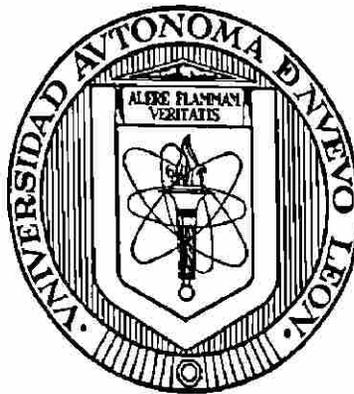
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



" CARACTERIZACIÓN DEL GEN MDR-1 EN PACIENTES
CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA "

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

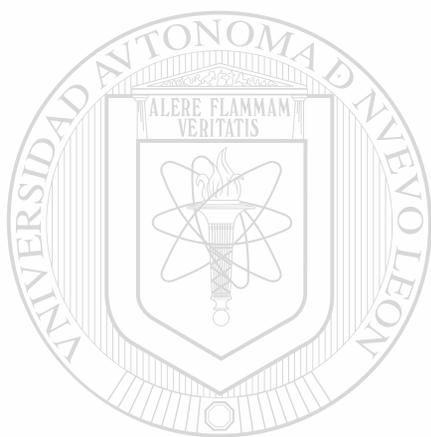
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M. en C. SERGIO DOMÍNGUEZ ARREVILLAGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

Agosto del 2005

TB
RC643
.D66
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**CARACTERIZACIÓN DEL GEN MDR-1 EN PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

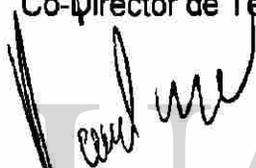
Aprobación de la Tesis:



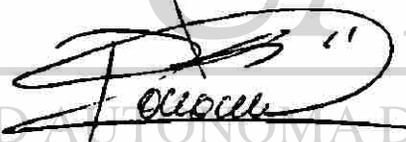
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Director de Tesis



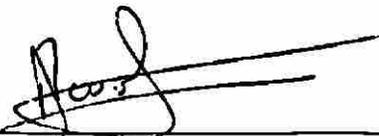
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



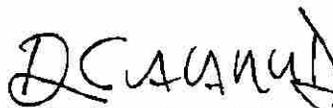
DR. DAVID GOMEZ ALMAGUER
Co-Director de Tesis



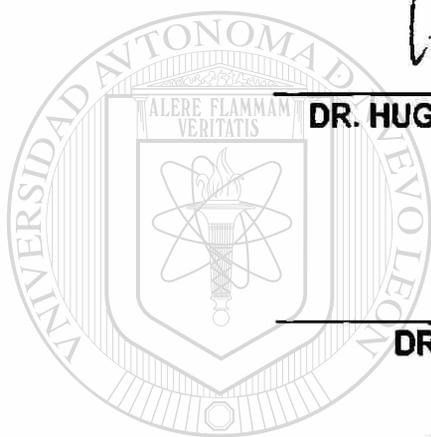
DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Comisión de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis

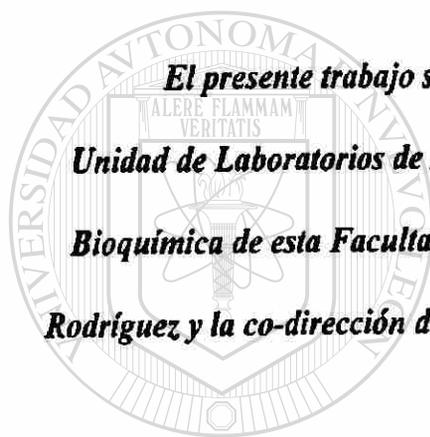


DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. David Gómez Almaguer y del Dr. Hugo. A. Barrera Saldaña

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Con el respeto y la admiración de siempre, agradezco profundamente a la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez, por todas sus enseñanzas, comprensión y paciencia. Gracias por confiar en mí y por permitirme trabajar a su lado para así cumplir una meta más en mi vida.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, le doy las gracias por todas las atenciones brindadas hacia mí y por la confianza que me ha dado siempre.

Al Dr. David Gómez Almaguer, le doy las gracias por todo el apoyo brindado a través de sus conocimientos y por permitirme trabajar con sus pacientes.

A los profesores que formaron parte de la comisión de tesis, Dra. Agnes Revol de Mendoza y Dra. Rocío Ortiz López gracias por apoyarme siempre con sus consejos, disposición y por sus recomendaciones durante la revisión del manuscrito.

A mis compañeros y amigos, Luis Miguel, Lolis, Hipólito, Belarmino, Karina y Angel gracias porque de alguna u otra forma me brindaron su apoyo y su tiempo.

A todos los compañeros de la ULIEG que convivieron conmigo.

A todo el personal de la ULIEG, ya que también formaron parte del equipo de trabajo en el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Chiapas, al PAICYT de la UANL y al PROMEP de la SEP por el apoyo económico brindado.

Al Dr. Donato Saldívar Rodríguez, director de la Facultad de Medicina de la UANL por su amistad y el apoyo brindado.

Al M. en C. Guillermo García García, director de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNACH por su amistad y el apoyo brindado.

Al M. en C. Jorge Ordóñez Ruíz, Rector de la Universidad Autónoma de Chiapas por su confianza y el apoyo que siempre me ha brindado.

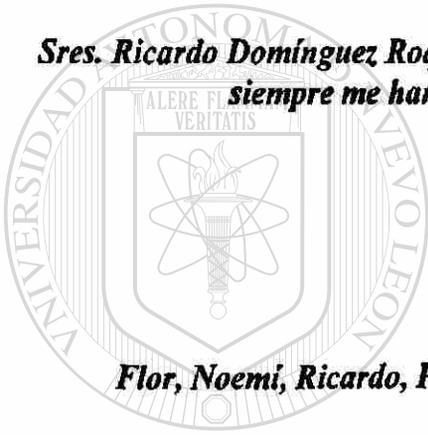
DEDICATORIA

A mis amores

***Mi esposa Marisol y mis hijos, Sergio y Mauricio, quienes son el motor de mi vida;
toda mi inspiración para luchar y seguir adelante.***

A mis padres

***Sres. Ricardo Domínguez Roque y Concepción Arrevillaga Calderón, por el amor que
siempre me han brindado, motivo de superación para mí.***



A mis hermanos

***Flor, Noemí, Ricardo, Patricia, Julio y Carlos, por estar siempre conmigo
y en todos mis planes.***

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis grandes amigos

***Erika, Hipólito, Paty, Cirilo, Octavio, Luis Miguel, Mireya, Carlos,
Alvaro, Olivia, y Marichuy.***

TABLA DE CONTENIDO

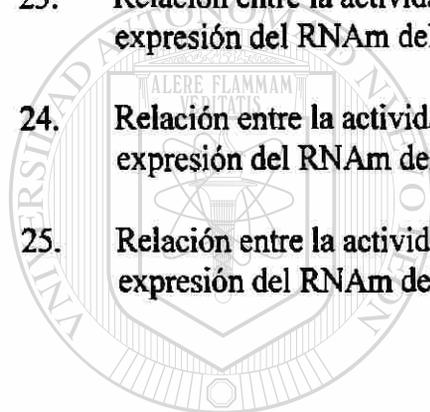
Capítulo		Página
I	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1 Resistencia a Múltiples Drogas en cáncer.....	2
	1.2 Mecanismos de resistencia a la quimioterapia.....	3
	1.3 Estructura del gen MDR-1.....	5
	1.4 Estructura de la glicoproteína P.....	6
	1.5 Expresión de la Gp-P.....	8
	1.6 Mecanismo de acción de la glicoproteína P.....	9
	1.7 Variaciones genéticas y polimorfismos del gen MDR-1.....	12
	1.8 Participación del gen MDR-1 en Leucemias.....	13
	1.9 Justificación.....	15
	1.10 Hipótesis.....	16
II	OBJETIVOS.....	17
	2.1 Objetivo general.....	17
	2.2 Objetivos específicos.....	17
III	MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
	3.1 Área de trabajo, reactivos, material diverso y equipo.....	18
	3.1.1 Área de trabajo.....	18
	3.1.2 Pacientes.....	18
	3.1.3 Reactivos y material diverso.....	19
	3.1.4 Equipo utilizado.....	21
	3.1.5 Programas y equipo de cómputo.....	22
	3.2 Métodos.....	23
	3.2.1 Toma de la muestra.....	23
	3.2.2 Estrategia experimental para el análisis de las muestras.....	23
	3.2.3 Obtención de células mononucleares (CMN) de sangre periférica.....	24
	3.2.3.1 Protocolo de separación de las CMN utilizando Ficoll-Hypaque.....	25
	3.2.4 Ensayo de actividad de la Gp-P.....	25
	3.2.4.1 Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P Utilizando rodamina 123 como sustrato.....	27
	3.2.5 Aislamiento del RNA total.....	28
	3.2.5.1 protocolo de extracción del RNA total de células mononucleares de sangre periférica.....	28
	3.2.6 Ensayo de retrotranscripción.....	30
	3.2.7 Nivel de expresión del gen MDR-1, Ensayo Taqman.....	31
	3.2.8 Análisis de los polimorfismos del gen MDR-1 (SNPs) Por PCR-RFLPs.....	33

3.2.9	Análisis estadístico.....	35
IV	RESULTADOS.....	36
4.1	Características de los pacientes con LLA estudiados.....	36
4.2	Actividad de la Gp-P.....	37
4.3	Frecuencia de los polimorfismos (SNPs) de la secuencia codificadora del gen MDR-1.....	38
4.3.1	Frecuencia del polimorfismo (SNP) A61G.....	38
4.3.2	Frecuencia del polimorfismo (SNP) T307C.....	40
4.3.3	Frecuencia del polimorfismo (SNP) G1199A.....	41
4.3.4	Frecuencia del polimorfismo (SNP) C1236T.....	43
4.3.5	Frecuencia del polimorfismo (SNP) G2677A.....	44
4.3.6	Frecuencia del polimorfismo (SNP) C3435T.....	41
4.4	Expresión del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.....	47
4.5	Correlación entre la expresión y actividad de la Gp-P del gen MDR-1 y la presencia de los polimorfismos.....	48
4.5.1	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo C1236T.....	49
4.5.2	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo G1199A.....	49
4.5.3	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo A61G.....	50
4.5.1	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo C3435T.....	51
4.6	Relación entre el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y la Respuesta clínica de los pacientes con LLA.....	52
V	DISCUSIÓN.....	54
VI	CONCLUSIONES.....	60
	REFERENCIAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Modelo estructural de la glicoproteína P (Gp-P).....	6
2.	Modelo de la actividad de la GP-P.....	8
3.	Estrategia experimental.....	24
4.	Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P.....	26
5.	RNA de pacientes con LLA.....	30
6.	Valores de actividad de la Gp-P.....	37
7.	Rangos de actividad de la Gp-P.....	38
8.	Digestiones con la enzima <i>Taq</i> I de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismos A61G.....	39
9.	Frecuencia del polimorfismo A61G en los pacientes con LLA.....	39
10.	Digestiones con la enzima <i>Ban</i> II de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismos T307C.....	40
11.	Frecuencia del polimorfismo T307C en los pacientes con LLA.....	41
12.	Digestiones con la enzima <i>Eco</i> 57I de los productos amplificados de 258 pb del polimorfismos G1199A.....	42
13.	Frecuencia del polimorfismo G1199A en los pacientes con LLA.....	42
14.	Digestiones con la enzima <i>Hae</i> III de los productos amplificados de 366 pb del polimorfismos C1236T.....	43
15.	Frecuencia del polimorfismo C1236T en los pacientes con LLA.....	44
16.	Digestiones con la enzima <i>Bsr</i> I de los productos amplificados de 220 pb del polimorfismos G2677A.....	44

17.	Frecuencia del polimorfismo G2677A en los pacientes con LLA.....	45
18.	Digestiones con la enzima <i>Sau 3AI</i> de los productos amplificados de 197 pb del polimorfismos C3435T.....	46
19.	Frecuencia del polimorfismo C3435T en los pacientes con LLA.....	46
20.	Expresión del gen MDR-1 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.....	47
21.	Expresión relativa normalizada del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.....	48
22.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C1236T y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	49
23.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo G1199A y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	50
24.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo A61G y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	51
25.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C3435T y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	52



UANL

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Mecanismos de resistencia a la quimioterapia.....	26
2. Funciones de la glicoproteína-P (Gp-P).....	27
3. Compuestos que interactúan con la Gp-P.....	29
4. Condiciones de la reacción de RT.....	30
5. Programa para la reacción de RT.....	31
6. Condiciones de la reacción de amplificación para DNAc	33
7. Programa de amplificación para distintos productos del DNAc del gen MDR-1.....	34
8. Secuencia de los iniciadores, enzimas de restricción y los fragmentos esperados para cada polimorfismo estudiado del gen MDR-1.....	35
9. Características de los pacientes con LLA.....	36
10. Relación entre el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y la respuesta clínica de los pacientes con LLA.....	42

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



NOMENCLATURA

l	Litros
ng	Nanogramo
μM	Micromolar
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
Gp-P	Glicoproteína PHormona del crecimiento humano
cm	Centímetro
mm	Milímetro
M	Molar
h	Hora
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
U	Unidades
mM	Milimolar
pg	Picogramo
BSA	Albúmina sérica bovina
min	Minuto
s	Segundo
g	Gramo
ml	Mililitro
pH	Potencial de Hidrógeno
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco's
kDa	Kilodaltons

kb Kilobases
nM Nanomoles
pb Pares de bases
mg Miligramo
dNTPs Dinucleótidos trifosfatos
 μ l Microlitro
rpm Revoluciones por minuto

nm Nanómetro

Abs Absorbancia

DNAc Ácido desoxirribonucleico complementario

PBS Amortiguador salina fosfatos

SBF suero bovino fetal

CMN Células mononucleares

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

RNAm RNA mensajero

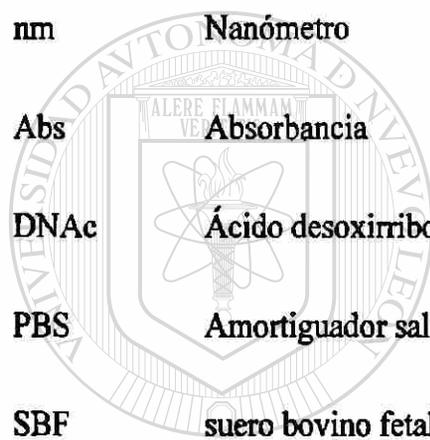
SNP Polimorfismo de un solo nucleótido

MDR Resistencia a múltiples drogas

RT Retrotranscripción

RR Riesgo relativo

P Probabilidad



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN CENTRAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

M. en C. Sergio Domínguez Arrevillaga

Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

Título del estudio:

CARACTERIZACIÓN DEL GEN MDR-1 EN
PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA

Número de páginas:

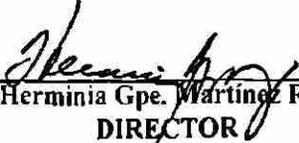
Candidato al grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería
Genética.

Área de estudio: Biología Molecular

Propósito y método del estudio. El gen MDR-1 es uno de los más estudiados en cuanto a su capacidad de conferir resistencia a drogas debido a su expresión o sobreexpresión en células tumorales. Este gen codifica para la glicoproteína P (Gp-P), una proteína transportadora dependiente de ATP, que es capaz de eliminar del interior de las células las sustancias citotóxicas, permitiendo su resistencia a la terapia antitumoral. Se han encontrado niveles altos de expresión de la Gp-P en tejidos normales de hígado, páncreas, riñón (túbulos renales), colon, yeyuno y corteza suprarrenal. Esto sugiere que podría tener un papel fisiológico en procesos de secreción. En tejidos tumorales se ha visto que la correlación entre el incremento de expresión de Gp-P y la resistencia a múltiples drogas debe ser la causa del fenotipo MDR. Se han reportado también cambios en la actividad y expresión de la Gp-P en algunos polimorfismos presentes en el gen MDR-1. Por lo anterior, se consideró importante realizar este estudio en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) para conocer la participación del gen MDR-1 en la resistencia al tratamiento con quimioterapia que se presenta en los pacientes. Se analizaron seis polimorfismos de la secuencia codificadora del gen y se relacionaron con el nivel de expresión, funcionalidad de la proteína Gp-P y la respuesta clínica del paciente. Los estudios de actividad se realizaron utilizando un bioensayo con rodamina 123 como sustrato de la Gp-P, los de expresión mediante PCR en tiempo real y la determinación de los polimorfismos se hicieron aplicando la técnica de RFLPs.

Contribuciones y conclusiones. Se evaluó la influencia de seis polimorfismos de la secuencia codificadora del gen MDR-1 sobre la expresión del RNAm y la actividad de la Gp-P en pacientes con LLA. Los SNPs que se analizaron fueron el A61G del exón 2, el T307C del exón 5, el G1199A del exón 11, el C1236T del exón 12, el G2677A del exón 21 y el C3435T del exón 26. De los seis polimorfismos estudiados, sólo se encontró diferencia significativa para el caso de la actividad de la Gp-P en los pacientes que portaban el polimorfismo C3435T, de los cuales, los que tenían el alelo C/C presentaron una mayor actividad de la Gp-P al ser comparados con los del alelo T/T; los portadores del alelo heterocigoto C/T tuvieron valores intermedios de actividad. Debido a la importancia que se le ha dado al polimorfismo C3435T y en base a los resultados significativos que encontramos con respecto a la actividad, también analizamos si existía alguna influencia de las variantes alélicas de este SNP sobre la respuesta clínica de los pacientes con LLA estudiados, y encontramos que existe 2.7 veces más riesgo de sufrir recaídas en aquellos que son homocigotos CC comparados con los pacientes CT/TT ($P = 0.029$).

Este es el primer estudio realizado en México en el que se analizó la participación del gen MDR-1 en pacientes con LLA y se correlacionaron los niveles de actividad y expresión de la Gp-P con la respuesta a la quimioterapia.


Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
DIRECTOR

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

En los últimos años se han alcanzado grandes éxitos en la quimioterapia del cáncer; algunas neoplasias pueden ser curadas con el uso de esta modalidad terapéutica y en otras, se consigue un efecto paliativo importante de incremento de la supervivencia. A pesar de ello, muchas de las neoplasias muestran resistencia inicial a la quimioterapia, o la adquieren en el curso del tratamiento, lo que constituye el mayor obstáculo para la curación de estos casos¹.

La actividad y toxicidad de la quimioterapia del cáncer dependen de la genética individual respecto a los blancos moleculares de los fármacos y de las enzimas involucradas en el metabolismo de los mismos. La quimioterapia es ampliamente utilizada como una modalidad de tratamiento en oncología, pero

su eficacia ha sido limitada, debido a que puede presentarse resistencia a múltiples fármacos, la cual se define como la resistencia celular a fármacos con[®] funcionalidad y estructuras diferentes.

En la quimioterapia de las enfermedades malignas, la resistencia a citotóxicos constituye un gran obstáculo para la curación de los pacientes. Se han identificado varios genes, proteínas y vías metabólicas implicados en este fenómeno.

Los tumores tienden a desarrollar o adquirir resistencia durante el curso del tratamiento, a pesar de haber presentado una buena respuesta inicial al mismo^{2,3}. Se estima que la resistencia a los medicamentos utilizados contribuye

a más del 90% de las muertes por cáncer^{4,5} por lo que éste es un problema importante que requiere ser abordado con la mayor eficacia posible⁶.

1.1 Resistencia a Múltiples Drogas en el cáncer

Uno de los mayores obstáculos a la aplicación de la quimioterapia en algunos tipos de tumores, es su resistencia a los medicamentos antineoplásicos utilizados, que⁷ puede ser intrínseca o adquirirse durante el tratamiento^{7,8,9}. Uno de los mecanismos mediante el cual se llega a esta resistencia, es el de la "multirresistencia a fármacos" (MDR o "multidrug resistance") que, aunque no es el único que se conoce, es uno de los más importantes. Una de las principales características de la MDR es que, en algunos casos, las células seleccionadas en función de su resistencia a un agente citostático son también resistentes a otros agentes que no poseen ningún tipo de analogía funcional o estructural, pues unos actúan como inhibidores de la síntesis de DNA o RNA, otros intervienen en la formación de tubulina, otros en el potencial de membrana. Lo único que tienen en común estos compuestos es que son anfipáticos y que poseen anillos planos hidrofóbicos. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son los alcaloides de la vinca, las antraciclinas o podofilotoxinas¹⁰.

Los oncólogos clínicos fueron los primeros en observar que cuando el cáncer era tratado con diferentes drogas, se desarrollaba una resistencia a muchos otros agentes citotóxicos, disminuyendo así la posibilidad de cura de esos tumores con la quimioterapia. Estas observaciones sugieren que en la mayoría de los casos la MDR es el resultado de cambios hereditarios en las

células tumorales, que causan niveles alterados de proteínas específicas o de proteínas mutadas, las cuales permiten que las células malignas sobrevivan en presencia de diferentes agentes citotóxicos. Esas alteraciones genéticas que confieren resistencia a las drogas, pueden afectar la dinámica del ciclo celular, la susceptibilidad de las células a la apoptosis, la incorporación o expulsión del medicamento a la célula o pueden inducir cambios en el metabolismo celular del agente o en la reparación del daño celular¹¹. Aunque existen reportes de muchos ejemplos de esas clases de resistencia, éstos se han realizado en cultivos celulares, mientras que se conoce muy poco de los datos clínicos en cuanto a los mecanismos de resistencia *in vivo* ^{12,13}

1.2 Mecanismos de resistencia a la quimioterapia

Los mecanismos de resistencia observados en células MDR son: disminución en la acumulación intracelular del fármaco, sobreexpresión de la

glicoproteína-P (Gp-P), inactivación metabólica mediada por glutatión (GSH), resistencia mediada por topoisomerasas, reparación y/o tolerancia al daño[®] celular inducido por el fármaco^{14,15,16} (tabla1). Estos mecanismos corresponden

a factores del individuo, del tumor o de las células, una vez que el medicamento ha alcanzado el citoplasma, se expone a diferentes mecanismos de detoxificación, algunos de ellos siempre están presentes, mientras que otros son inducidos por la presencia del compuesto. Incluso cuando el citostático ha alcanzado su último objetivo y ha provocado daño en el DNA, algunas células son resistentes debido a la gran capacidad de reparación de ese daño²⁰.

También se han encontrado niveles elevados de enzimas metabolizadoras de radicales libres tales como superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, asociadas a la resistencia a fármacos¹⁶. La Gp-P asociada a multirresistencia es el factor farmacológico, bioquímico y genético mejor caracterizado y representa una de las mayores barreras para el éxito de la quimioterapia del cáncer¹⁷. Se han encontrado niveles relativamente elevados de la proteína GpP en biopsias de una gran variedad de tumores¹⁸. Las células cancerosas son más eficientes que las normales para cambiar su respuesta a la quimioterapia y desarrollar resistencia. Así mismo, son más propensas a sufrir mutaciones y sus poblaciones son más heterogéneas¹⁹.

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a la quimioterapia

<p>1. Factores del hospedero: <u>Alteraciones cinéticas de los fármacos</u> a) Disminución en absorción-activación b) Aumento en excreción-degradación c) Alteración en proteínas de transporte</p> <p>2. Factores del tumor: a) Metástasis</p> <p>3. Factores celulares: <u>Alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática</u> a) Disminución en acumulación de fármacos b) Disminución de la entrada de fármacos c) Aumento de la excreción (Gp-P) <u>Alteraciones en metabolismo celular</u> a) Disminución de la activación b) Aumento de la degradación <u>Aumento niveles de moléculas detoxificantes</u> a) Glutatión b) GST c) Catalasa d) Metalotioneínas <u>Aumento de enzimas neutralizadoras de radicales libres</u> a) Catalasa b) Superoxidodismutasa Reparación de DNA Tolerancia al DNA dañado Alteración en los blancos celulares</p>
--

Modificado a partir de Pérez y cols¹⁵.

1.3 Estructura del gen MDR-1

El gen MDR-1 es uno de los más estudiados en cuanto a su capacidad de conferir resistencia a drogas debido a su expresión o sobreexpresión en células tumorales²⁰. Este gen codifica para la Gp-P, una proteína transportadora dependiente de ATP, que es capaz de eliminar del interior de las células las sustancias citotóxicas, permitiendo su resistencia a la terapia antitumoral^{21,22}. Aunque en otras especies pueden encontrarse hasta seis genes pertenecientes a la familia MDR, en humanos se han identificado dos: el MDR-1 que parece ser el responsable del fenotipo MDR, y el MDR2 que ha sido implicado en el transporte de fosfatidilcolina^{23,24}.

El gen MDR-1 codifica para un RNA mensajero (RNAm) de 4.5 kb, presente en las células con fenotipo MDR en proporción a su grado de resistencia. La sobreexpresión del gen precede frecuentemente a su

amplificación^{25,26}. Los genes MDR en el hombre, están localizados en tandem en el cromosoma 7q21. El gen MDR-1 comprende un fragmento de 120 kb, y está constituido por 29 exones y 28 intrones, presenta dos sitios de iniciación de la transcripción: un sitio principal localizado a 136-140 nucleótidos río arriba del codón de iniciación ATG del DNAC que utiliza la mayoría de las líneas celulares y tejidos normales y un sitio accesorio encontrado en ciertas líneas celulares resistentes seleccionadas²⁷. Una región de 0.43 kb en posición 5' del sitio principal de iniciación de la transcripción, es suficiente para asegurar una actividad promotora *in vivo*²⁸. Esta secuencia denominada promotor proximal (P1), la cual no contiene secuencias TATA habitualmente presentes en los

promotores activos, aunque si tiene una secuencia consenso CAAT, una región rica en GC, además de múltiples sitios SP1. En el promotor del gen MDR-1 humano, el sitio AP1 situado entre las posiciones -121 y -115 es un sitio de regulación negativo²⁸.

1.4 Estructura de la glicoproteína P

La Gp-P está formada por 1,280 aminoácidos con dos dominios de unión a ATP citoplasmáticos y dos dominios hidrofóbicos, formados cada uno de ellos por seis fragmentos transmembrales que determinan la especificidad de sustrato, al formar la vía por la que éste atraviesa la membrana (Fig. 1). Esta estructura es similar a la de la superfamilia de proteínas transportadoras tipo ABC (de "ATP binding cassette")²⁹ que cuenta con más de cuarenta miembros en bacterias y en eucariotas³⁰.

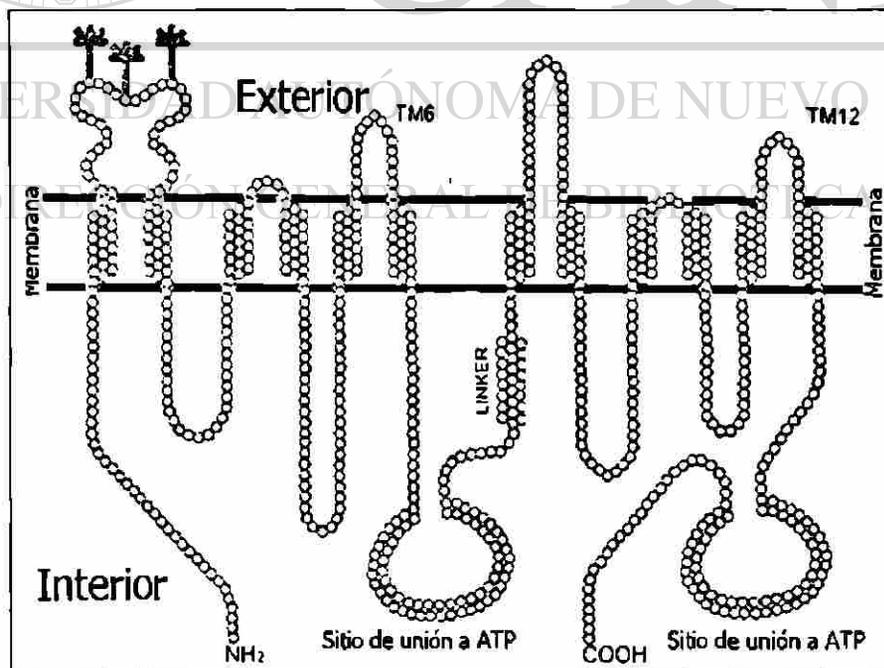


Fig. 1. Modelo estructural de la glicoproteína P, que evidencia los diferentes dominios funcionales¹²

La molécula de Gp-P consiste en dos monómeros unidos entre sí^{31,32} y cada monómero de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales unidos^{33,34}, dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal, que contiene la secuencia consenso de unión e hidrólisis del ATP³⁵. La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal³² (Fig.1). Los segmentos transmembranales están orientados de manera que el extremo C-terminal se sitúa en el lado citoplásmico de la membrana. Los tres pares de segmentos transmembranales están separados por cadenas largas de aminoácidos en la cara citoplásmica de la membrana y cadenas cortas en la superficie celular³⁶. Además, la molécula tiene residuos de carbohidratos, situados en el lado externo de la membrana, cerca del extremo N-terminal de la molécula³⁷ (Fig.1). Al menos 20 kDa de los 170-180 kDa de la proteína son debidos a los carbohidratos. Existen fuertes evidencias para asegurar que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte o reconocimiento de fármacos. El estudio de las secuencias de Gp-P muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembranal N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplásmicos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de drogas al exterior de la célula³⁸. Esta proteína actúa como una bomba de expulsión dependiente de energía. La salida se realiza a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras que pueden ser un péptido o una proteína¹⁶ (Fig. 2).

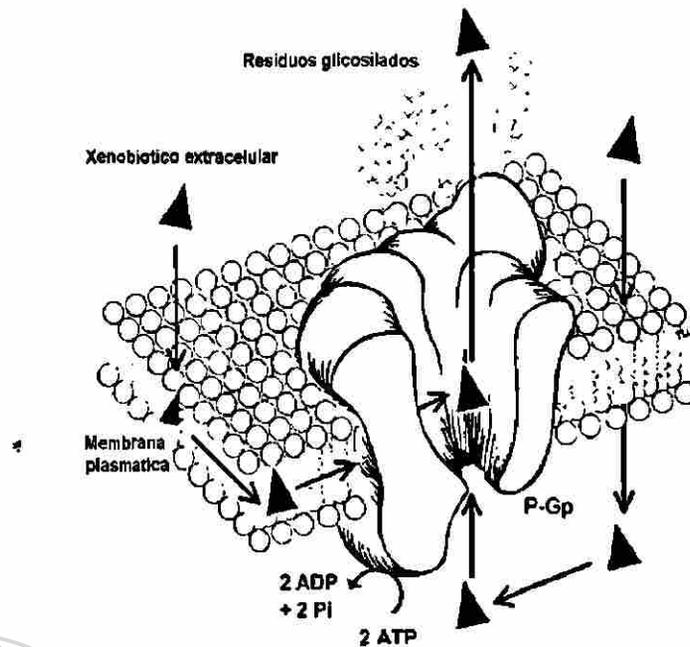


Fig. 2. Modelo de la actividad de la Gp-P. Transporte de fármacos mediados por la Gp-P, que puede ocurrir a nivel de la membrana plasmática o del compartimento intracelular³⁸

1.5 Expresión de la Gp-P

El estudio de las alteraciones en la respuesta a diversos compuestos y la comparación de las membranas celulares de células sensibles y multirresistentes, ha puesto de manifiesto cambios en la estructura y función de la membrana plasmática²⁰. El hallazgo más importante, descubierto en células de hámster chino resistentes a colchicina³⁶, fue la sobreexpresión de la Gp-P^{40,41} codificada por el gen MDR-1, la cual es responsable de la disminución en el acúmulo intracelular de drogas antineoplásicas, observada en células multirresistentes³⁵. El grado de resistencia usualmente, pero no siempre, se encuentra correlacionado con los niveles de expresión de Gp-P cuando una línea celular se hace progresivamente más resistente *in vitro*⁴².

Se han encontrado niveles altos de expresión de la Gp-P en tejidos normales de hígado, páncreas, riñón (túbulos renales), colon, yeyuno y corteza

suprarrenal⁴³. Esto sugiere que podría tener un papel fisiológico en procesos de secreción. En tejidos tumorales se ha visto que la correlación entre el incremento de expresión de Gp-P y la resistencia a múltiples drogas debe ser la causa del fenotipo MDR⁴⁴.

Además de la Gp-P, se ha encontrado en células multirresistentes la sobre-expresión de otra proteína de membrana con actividad ATPasa de 190 kDa, denominada "multidrug resistance- associated protein" (MRP)^{45,46} que igual que la Gp-P mantiene bajos los niveles intracelulares de compuestos empleados en quimioterapia. La expresión de la proteína MRP está asociada con altos niveles de glutatión S-transferasa⁴⁷ y en algunos tipos celulares se expresa conjuntamente con la Gp-P⁴⁸.

1.6 Mecanismo de acción de la glicoproteína P

La Gp-P parece ser la responsable de una disminución en los niveles del fármaco en el interior de las células tumorales, mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP (de ahí proviene el nombre de glicoproteína P). Está directamente implicada en la permeabilidad celular y es el motivo de que algunos cánceres no respondan al tratamiento con fármacos antitumorales, lo que tiene consecuencias fatales para el paciente²¹. Esta proteína actúa como una bomba de expulsión de xenobióticos y así limita la concentración intracelular de las drogas y diversos metabolitos. Constituye un sistema de detoxificación natural que se expresa en varios tejidos humanos normales asociados con funciones secretoras o de barrera⁴⁹ (Fig. 2 y Tabla 2). Se expresa en canaliculos biliares, conductos pancreáticos, intestino delgado y

grosso, túbulo proximal del riñón, glándula adrenal, placenta y en las células endoteliales del sistema nervioso central y del testículo, pudiendo estar implicada en los supuestos santuarios de algunos procesos malignos como la leucemia linfoblástica aguda⁵⁰.

Tabla 2. Funciones de la glicoproteína-P.

1. Protección frente a xenobióticos externos (fármacos, tóxicos medioambientales, etc).
2. Transporte de hormonas esteroideas.
3. Regulación de la actividad transportadora de ión cloruro.
4. Protección frente a tóxicos endógenos.
5. Transporte de colesterol en epitelio del tubo digestivo.
6. Transporte de factores de crecimiento y citocinas en células hematopoyéticas y NK.
7. Regulación del fenómeno de apoptosis.
8. Transporte de péptidos vinculados al reconocimiento antigénico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La mayoría de los sustratos de la Gp-P son productos naturales e incluyen alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina); antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina); epipodófiloxinas (etopósido, tenipósido) y taxanos (paclitaxel, taxotero), inclusive agentes terapéuticos tales como inhibidores de proteasas en HIV, entre otras drogas¹², son también exportados por la Gp-P (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos que interactúan con la Gp-P.

Quimioterápicos	Otros Citotóxicos	Agentes Revertidores del MDR	Péptidos Cíclicos y Lineares
Daunorrubicina	Colchicina	Verapamil	Actinomicina D
Doxorrubicina	Emetina	Nifedipino	Gramicidina D
Mitoxantrona	Bromuro de etidio	Azidopina	Valinomicina
Etoposido	Puromicina	Quinidina	feromona de levadura
Teniposido	Mitramicina	Amiodarona	N-acetil-leucil-leucil-norleucina
Vinblastina		Reserpina	Otros compuestos
Vincristina		Ciclosporina A	Hoechst 33342
Mitomicina C		FK506	Rodamina 123
Paclitaxel		Rapamicina	Calceina - AM
Actinomicina D		Progesterona	
Topotecan		Forskolina	

Aunque no se conoce una estructura consenso de interacción con la proteína, se considera que los sustratos relacionados con ella son hidrofóbicos y anfipáticos⁵¹.

Consecuentemente la sobreexpresión de la Gp-P por amplificación del gen MDR-1 es considerada como un mal pronóstico en ciertas enfermedades tales como las leucemias, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, etc⁵².

1.7 Variaciones genéticas y Polimorfismos del gen MDR-1

A pesar de la correlación existente entre la sobreexpresión del gen MDR-1 y la aparición de resistencia a drogas en experimentos de cultivo celular y en algunos tumores, se considera que aún falta mucho por conocer acerca de las variaciones individuales en la expresión del gen. En algunos casos como en ciertos tumores, la amplificación del gen MDR-1 es la responsable del incremento de los niveles y función de la proteína Gp-P, mientras que en otros padecimientos malignos, el gen MDR-1 parece ser inducido⁵³. Por tal motivo se piensa que las alteraciones o variaciones genéticas individuales en las regiones estructurales o regulatorias del gen MDR-1 pueden estar involucradas en los procesos de resistencia.

Considerando el papel que desempeña la proteína Gp-P en la resistencia, se puede asumir que de manera natural ocurren variaciones genéticas en el gen MDR-1 que pueden afectar la variabilidad interindividual en la farmacocinética y la dinámica de muchas drogas. Uno de los primeros trabajos relacionados a investigar los polimorfismos del gen MDR-1 en humanos fue realizado por Mickley en 1998, quien reportó la existencia de polimorfismos en el exón 21 y 24 (G2677T y G2995A) en líneas celulares tratadas con drogas, en linfomas malignos refractarios y en sujetos voluntarios sanos. Los polimorfismos G2677T y G2995A en el exón 21 y 24, respectivamente, producen un cambio en la secuencia de la proteína pero no afectan el nivel de expresión MDR-1⁵⁴ . El primer estudio sistemático de los polimorfismos del gen, fue realizado por Hoffmeyer en el 2000, trabajo en el cual todos los 28 exones, la región central del promotor y las uniones intron-

exón fueron secuenciados a partir de DNA genómico de individuos caucásicos sanos. Se reportaron 15 polimorfismos en nucleótidos específicos (SNPs), incluyendo 6 en la región codificadora, tres de los cuales alteran la secuencia primaria de la proteína⁴⁶.

Se ha relacionado al polimorfismo encontrado en el exón 26, C3435T, con cambios en los niveles intestinales de la proteína Gp-P que influyen en la ingestión de sustratos administrados por vía oral. Individuos homocigotos para este polimorfismo (TT) presentan un bajo nivel de expresión, pero un gran aumento en la actividad de Gp-P y un incremento en los niveles plasmáticos de digoxina, sustrato administrado oralmente y cuya concentración plasmática se correlaciona con la cantidad de Gp-P intestinal y como indicador de la actividad de la proteína⁴⁶. En la mayoría de los estudios se ha asociado un aumento del nivel de expresión de la proteína, con una mayor actividad de ésta; sin embargo según Hoffmeyer este es un caso excepcional donde el efecto de la mutación es inverso. El polimorfismo C3435T, no se encuentra en el promotor y se desconoce exactamente como influye sobre la expresión de la proteína transportadora. Se considera que puede estar participando en cambios no identificados en puntos de control de la expresión, como potenciadores u otras secuencias importantes para el procesamiento del RNAm.

1.8 Participación del gen MDR-1 en Leucemias

En cuanto a la expresión del gen MDR-1 en padecimientos hematológicos malignos como las leucemias, se ha reportado que existe una sobreexpresión del gen MDR-1 en algunos pacientes y esto contribuye a la

resistencia a la quimioterapia⁵⁵. Se ha hecho el análisis de mutaciones puntuales en el promotor a partir del DNA de algunos pacientes (9 con leucemia mieloide aguda, 4 con leucemia linfocítica crónica , 1 con leucemia linfocítica aguda y 1 con linfoma no Hodgkin's), en los cuales mediante secuenciación se detectó una mutación puntual en el promotor , transición T-C en la posición -8, lo cual se consideró como parte de la patogénesis y progreso de la enfermedad⁵⁶. En un estudio clínico realizado al respecto, se considera que la expresión de la proteína Gp-P en leucemias constituye un pronóstico adverso, manifestado por la resistencia al tratamiento y recaída del paciente⁵¹.

En un estudio más reciente se reportó que el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 puede estar involucrado tanto en la susceptibilidad como en la respuesta a tratamiento en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Los que presentan el genotipo TT tienen mayor riesgo de desarrollar LLA comparado con otros individuos y de esos pacientes los que tienen el genotipo CC presentan un mal pronóstico clínico⁵⁷.

Es importante mencionar que en nuestra región no se han realizado estudios relacionados con la expresión, actividad y polimorfismos del gen MDR-1, el cual como se ha mencionado participa importantemente en la respuesta a tratamientos en los que la mayoría de los fármacos son sustratos naturales para la Gp-P. Para este estudio es muy relevante analizar la participación de este gen en pacientes con LLA ya que es uno de los padecimientos malignos en los que las células de los pacientes presentan el fenotipo MDR y puede afectar la respuesta clínica de los mismos.

1.9 Justificación

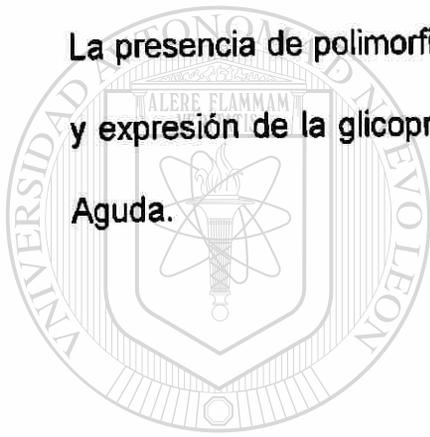
A pesar de la correlación existente entre la expresión del gen MDR-1 y la resistencia a drogas en experimentos de cultivo celular y en tumores, aún falta mucho por conocer acerca de la relación entre los polimorfismos del gen, su expresión y la actividad de la proteína Gp-P, ya que la mayoría de los estudios se han realizado a partir de muestras de sujetos sanos y en tejidos donde normalmente se expresa la proteína como en placenta, intestino, etc.

Por lo anterior se ha considerado que uno de los genes de mayor importancia en la farmacogenética en humanos y sobre todo en cáncer es el MDR-1, ya que muchos fármacos utilizados como agentes antitumorales son sustratos para la glicoproteína-P (Gp-P); la cual es responsable del transporte de más del 30% de todas las drogas y del 90% de las utilizadas contra el cáncer, lo que afecta directamente al tratamiento en los pacientes que sufren padecimientos neoplásicos¹⁷.

En el caso de la LLA, es importante caracterizar el gen MDR-1 y conocer si tiene relación con la resistencia al tratamiento que se presenta en los pacientes, ya que se conoce poco y existen controversias en cuanto a si en este padecimiento, las variaciones en la secuencia codificadora del gen se correlacionan con el nivel de expresión y funcionalidad de la proteína Gp-P y si esto pudiera estar participando de manera directa con la resistencia. Con este tipo de estudios se podría determinar el grado de resistencia antes o durante la quimioterapia tanto de manera global como individual, lo cual podría servir para hacer una mejor elección de medicamentos y así obtener una mayor eficacia terapéutica.

1.10 Hipótesis

La presencia de polimorfismos en el gen MDR-1 afecta los niveles de actividad y expresión de la glicoproteína P en los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar los niveles de expresión, la funcionalidad de la proteína Gp-P y los polimorfismos presentes en el Gen de Resistencia a Drogas MDR-1 en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda y correlacionar esta información con la respuesta clínica del paciente debido a la quimioterapia.

2.2 Objetivos específicos

- 1.- Determinar la funcionalidad de la proteína transportadora Gp-P en los pacientes con diagnóstico de LLA.
- 2.- Cuantificar la expresión del gen MDR-1 a nivel del RNAm en los pacientes con LLA.
- 3.- Determinar los polimorfismos (SNPs) que han sido identificados en la secuencia codificante del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.
- 4.- Relacionar la presencia de los polimorfismos del gen con los resultados del nivel de expresión, funcionalidad de la Gp-P y con el comportamiento clínico del paciente con LLA.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1 Área de trabajo, reactivos , material diverso y equipo

3.1.1. Área de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Las muestras fueron tomadas en las instalaciones del Centro Regional para el Estudio, Investigación y Tratamiento de la Leucemia del Hospital Universitario (CREIT) de la U.A.N.L.

3.1.2 Pacientes

Se incluyeron en el estudio 55 individuos que acudieron al CREIT del Hospital Universitario de la U.A.N.L., que tuvieron el diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda , y que aceptaron voluntariamente participar en el proyecto mediante la firma de una carta de consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con diagnóstico de LLA y que aceptaran participar en el estudio (carta de consentimiento informado)

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con diagnóstico distinto de LLA y que no aceptaran participar en el estudio

3.1.3 Reactivos y material diverso

- Las endonucleasas de restricción empleadas para determinar los genotipos MDR-1 por RFLPs de los pacientes LLA se adquirieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, y Gibco-BRL- Life Technologies, Inc (Gaithersburg, MD).
- El fenol utilizado en las extracciones de los ácidos nucleicos y los reactivos inorgánicos se adquirieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO).

-
- La enzima Taq DNA polimerasa, el cloruro de magnesio, el buffer de reacción y los dNTPs utilizados para la PCR fueron comprados a Promega Corp. (Madison, WI, EUA).

- El RNAsin utilizado en las reacciones de retrotranscripción fue de la marca Ambion (Woodward, TX, EUA).

- Los juegos de iniciadores fueron comprados a Biomol S.A de C.V. (México, D.F, México).

- Para la electroforesis se utilizó: Agarosa (Invitrogen), trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, EUA).

- Para la síntesis de DNAc se utilizó la enzima MMLV de Invitrogene (Carsbad, Ca, USA).
- Los tubos Eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml y las puntillas de diversos volúmenes fueron compradas a Biomol, S.A d C.V.(México, D.F, Mx).
- La Rodamina 123 utilizada para el ensayo de actividad de la Gp-P de los pacientes con LLA se adquirió en Sigma Aldrich .
- Los tubos cónicos de 15 y 50 ml utilizados para la separación de las células mononucleares de los pacientes LLA, fueron de la marca Falcon (Cell Associates, Inc. Houston, EUA).
- El cloroformo y el etanol utilizado en las extracciones de ácidos nucleicos fueron de la marca Merck (Gibbson, NJ, EUA).
- Se utilizó suero bovino fetal inactivado para el cultivo de las células mononucleares de la marca Sigma Aldrich .
- Las jeringas utilizadas para la toma de muestra de los pacientes fueron de la marca Becton Dickinson.
- El kit de retrotranscripción utilizado para la síntesis de DNAc para la PCR en Tiempo Real fue (High Capacity DNAc Archive Kit ,Applied Biosystems, Foster City CA, USA)
- Se utilizó como marcador de peso molecular una escalera de DNA de 100 pb de la marca Gibco BRL

3.1.4 Equipo utilizado

- Microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 utilizadas para centrifugar las muestras a temperatura ambiente.
- Centrifuga Eppendorf refrigerada modelo 5403 utilizada para centrifugar las muestras a 4 °C
- Ultracongelador vertical de – 70 °C (Marca SO-LOW, Cincinnati, Ohio, USA) utilizado para almacenar y precipitar el RNA de las muestras.
- Ultracongelador vertical de – 20 °C (Marca TORREY, Mx) utilizado para almacenar los reactivos y DNAs de las muestras.
- Cámaras de electroforesis horizontal marca BioRad (Hercules, CA, EUA) utilizada en la PCR-RFLP.
- Fuente de poder Biorad (Hercules, CA, EUA) utilizada para separar las muestras de ácidos nucleicos.
- Horno de microondas GoldStar modelo MA-857M utilizado para calentar soluciones y para la preparación de la agarosa.
- Campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MO, EUA) donde se realizaron las maniobras de cultivo celular en condiciones estériles.
- Incubadora con CO₂ (NAPCO SCIENTIFIC COMPANY CELL, EUA) utilizada para incubar las células mononucleares de los pacientes LLA.
- Balanza digital Sartorius modelo 1206 MP, (Camibh Gottingen, Alemania), donde se pesaron los reactivos utilizados para diversas

soluciones.

- Micropipetas marca Wilson Raining Instruments Co, Inc. (Emeryville, CA, EUA) de 10, 20, 200 y 1000 μ l.
- Ultraconcentrador (Savant, Labconco) utilizado para secar las pastillas de RNA.
- Espectrofotómetro (Beckman, Du-70) utilizado para cuantificar el RNA
- Microscopio invertido marca Karl Zeiss utilizado para la observación y conteo de las células de los pacientes.
- Fluorómetro (Versafluor, Fluorometer System; BIO-RAD) utilizado para cuantificar la rodamina 123 en el ensayo de actividad de la Gp-P.
- Vortex (Mixer 37600, Thermolyne, Iowa, USA) utilizado para mezclar las muestras en los procesos de extracción del RNA

3.1.5 Programas y equipo de cómputo

El procesamiento de datos se realizó en computadoras marca Macintosh modelo Classic II y PC IBM. Se empleó el procesador Office XP 2002.

También se utilizó un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Documentation System 1000, BIO-RAD). Los programas de biología molecular empleados fueron *Oligo* 4.0, *Amplify* 1.0 y el DNA Strider™ 1.1 (© 1989, France), así como el programa Analyst de BIO RAD (Hercules, CA, EUA).

El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP y Microsoft® Power Point XP de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel XP y un paquete estadístico comercial (GBSTAT versión 10.0 of Dynamic Microsystems, Inc., Copyright 2004).

Los programas utilizados por vía Internet fueron: *Entrez* (Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), BLAST Network Service (Blaster); GenBank. El navegador empleado para Internet fue Microsoft Explorer Versión 6.0 (Microsoft Corporation).

3.2 Métodos

3.2.1 Toma de la muestra

A los pacientes con LLA que aceptaron participar en el estudio, se les tomó una muestra de 5-8 ml de sangre periférica por punción venosa la cual se colocó en tubos con heparina, se mezcló y se transportó en hielo al Laboratorio de Biología Celular donde se continuó inmediatamente con la estrategia experimental del estudio.

3.2.2 Estrategia experimental para el análisis de las muestras

A partir de las muestras de sangre de los pacientes, se obtuvieron las células mononucleares utilizando un gradiente de ficoll. Una parte de las células se utilizó para medir la actividad de la proteína Gp-P; la otra parte se empleó

para extraer el RNA , sintetizar el DNAc y así cuantificar la expresión y realizar el análisis de los genotipos del gen MDR-1 (Fig. 3).

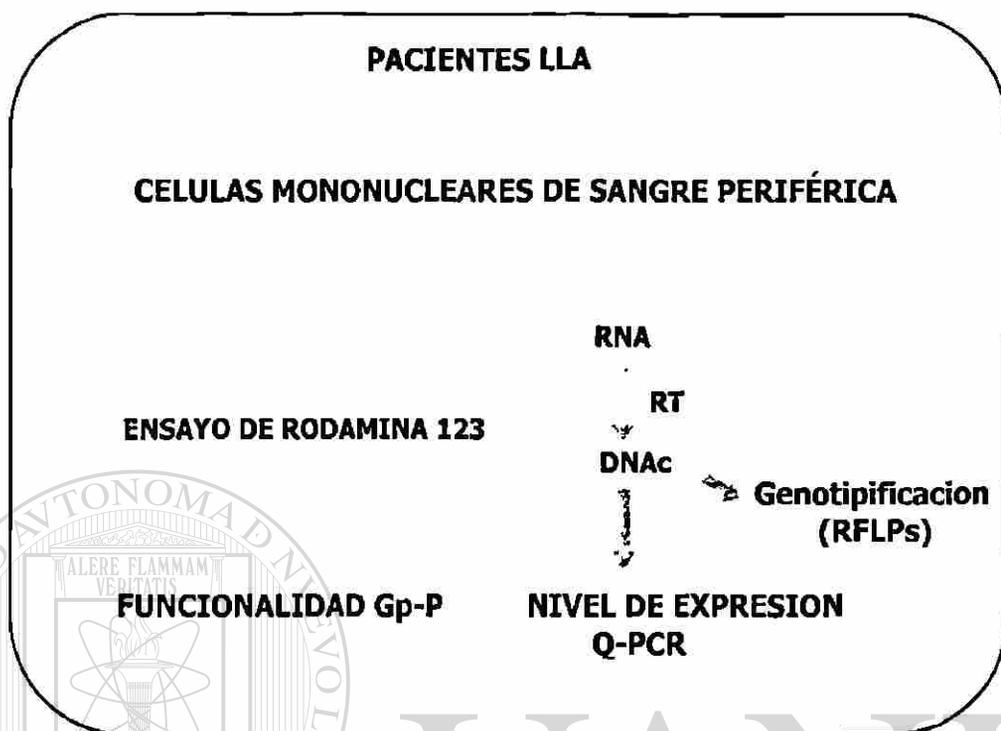


Fig. 3. Estrategia experimental. Se esquematiza el procedimiento general empleado para la determinación de la actividad, nivel de expresión y análisis de los polimorfismos del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



3.2.3 Obtención de células mononucleares (CMN) de sangre periférica.

A partir de 5-8 ml de sangre periférica obtenida de los pacientes, se obtuvieron las CMN utilizando para esto la técnica de separación por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. Las células obtenidas se contaron en una cámara de Neubauer y se comprobó la viabilidad utilizando el colorante supravital azul de tripano. Con las CMN obtenidas se realizaron los ensayos de funcionalidad de la proteína Gp-P, se obtuvo el RNA total para determinar el nivel de expresión y se analizaron los polimorfismos de la secuencia

codificadora del DNAC del gen MDR-1.

3.2.3.1 Protocolo de separación de las CMN utilizando Ficoll-Hypaque⁵⁸.

Una vez obtenida la sangre de los pacientes, ésta se diluyó con PBS 1X en una proporción 1:1 e inmediatamente se colocó la mezcla en un tubo falcon de 15 ml que contenía 3 ml de Ficoll-Hystopaque (Sigma, Aldrich) con un gradiente de densidad de 1.077 g/mL y después se agregaron de 5 -8 ml de sangre con mucho cuidado para no romper el gradiente de densidad. La cantidad de Ficoll-Hystopaque corresponde aproximadamente a la tercera parte del volumen de sangre a separar. Se centrifugaron los tubos durante 30 min a 4°C (1300 rpm), para luego separar con cuidado el anillo de células mononucleares de la interfase con una pipeta Pasteur, y éstas se depositaron en otro tubo falcon para lavarlas dos veces con PBS 1X, centrifugando entre cada lavado a 1500 rpm durante 15 min. Después del último lavado, se decantó el PBS y el paquete de células obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Invirogen). Se contaron las células, en una cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano (1:10) y se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 cel/ml.

3.2.4 Ensayo de actividad de la Gp-P⁵⁹

Las CMN obtenidas del paciente se utilizaron para evaluar la actividad de la proteína Gp-P utilizando para ello un sustrato fluorescente, la rodamina 123.

El ensayo consistió en dos fases, la primera llamada de inclusión en donde las células fueron incubadas con el colorante sustrato. En la segunda fase llamada de exclusión, las CMN previamente lavadas, se incubaron únicamente con el medio de cultivo. Se midió la intensidad de fluorescencia intracelular tanto en la fase de inclusión como en la de exclusión, se sacó una relación y esta fluorescencia fue proporcional a la cantidad de rodamina 123 retenida por la célula. Cabe mencionar que se utilizó Ciclosporina A como sustancia bloqueadora de la Gp-P para comprobar la funcionalidad de la proteína y del ensayo utilizado (Fig. 4). Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de 10 individuos sanos para estandarizar el protocolo.



Fig. 4. Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P. Se esquematiza como se midió la actividad de la Gp-P mediante la cuantificación de la rodamina 123 intracelular en las fases de inclusión y exclusión.

3.2.4.1 Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P utilizando rodamina 123 como sustrato

Muestras por duplicado de 1×10^6 CMN obtenidas del paciente o de individuos sanos fueron incubadas a 37°C en una incubadora con 5% de CO_2 (Napco Scientific Company, EUA) durante 90 min en 6 tubos falcon conteniendo 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) con 200 ng de rodamina 123 (Sigma Aldrich) (fase de inclusión). Transcurrido el tiempo se centrifugaron todos los tubos, se eliminó el medio con rodamina 123 por decantación y se lavaron dos veces las células con PBS 1X, centrifugando entre cada lavado a 1000 rpm durante 5 min (Centrifuga DINAC, Becton Dickinson). En esta fase las CMN de dos de los tubos se lisaron con 2 ml de H_2O destilada para luego cuantificar la rodamina 123 incluida en las células, utilizando para ello un fluorómetro ((Versafluor, Fluorometer System; BIO-RAD). Para la fase de exclusión y bloqueo, los 4 tubos restantes se incubaron nuevamente durante 60 minutos, dos de ellos con 1 ml de medio RPMI 1640 sin rodamina 123 y los otros dos con 1 ml del mismo medio conteniendo $5 \mu\text{g}$ de Ciclosporina A. Posteriormente se midió la rodamina intracelular aplicando el mismo procedimiento mencionado en la primera fase del ensayo. Se utilizó un estándar de rodamina 123 de concentración conocida para sacar la intensidad de fluorescencia relativa. Esta fluorescencia fue proporcional a la cantidad de rodamina 123 retenida por la

célula e inversamente proporcional a la actividad de la proteína transportadora Gp-P (Fig. 4).

3.2.5 Aislamiento del RNA total

La extracción del RNA total a partir de las células mononucleares de los pacientes fue necesaria para realizar el análisis de expresión y la determinación de los polimorfismos de la secuencia codificante del gen MDR-1.

La extracción de RNA total se llevó a cabo con el método de isotiocianato de guanidina fenol-cloroformo (Chomczynski, 1987)⁶⁰.

3.2.5.1 Protocolo de extracción del RNA total de células mononucleares de sangre periférica.

Las células mononucleares de sangre periférica de cada paciente contenidas en los tubos cónicos Falcon se colocaron en hielo, se les eliminó el medio de cultivo por decantación y se lavaron tres veces con 3 ml de PBS 1X[®] pH 7.4 (8 g de NaCl, 0.2 g de KCl y 1.44 g de Na₂HPO₄ en 1 litro de agua destilada). Posteriormente las células se lisaron con 0.5 ml de solución D (Solución patrón: 125 g de isotiocianato de guanidina en 146.5 ml de agua DEPC, 1 ml de dietilpircarbonato en 999 ml de agua milliQ, calentando para favorecer la disolución, 8.8 ml de citrato de sodio 0.75 M pH 7 y 13.2 ml de sarcosil al 10%. Solución de trabajo: a 50 ml de la solución patrón se le adicionaron 0.36 ml de β-mercaptoetanol, el lisado se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml y se adicionaron 50 µl de solución de acetato de sodio 2 M

pH 4.0, se agitó por inversión. Se agregaron 0.5 ml de fenol saturado con agua tratada con dietilpirocarbonato y se agitó por inversión. Se agregaron 0.1 ml de solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), luego se agitó en vortex (Mixer 37600, Thermolyne) por 10 seg. para después incubar en hielo por 15 min. La muestra se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5403), se recuperó la fase superior y el RNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y los tubos se incubaron por 1 h a -70°C para precipitar el RNA. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm y a 4°C para sedimentar el RNA, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de solución D, la pastilla formada se resuspendió con una puntilla, se adicionaron 0.5 ml de etanol absoluto frío y se dejó precipitar de nuevo a -70°C (Ultracongelador vertical, SO-LOW), por una 1h. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y la pastilla formada se lavó con etanol al 70% en agua DEPC y se centrifugó de nuevo. La pastilla de RNA se secó en el evaporador -concentrador (Labconco) por 15 min y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC. La cantidad y calidad del RNA se determinó por espectrofotometría (Beckman, Du-70), para esto se tomaron 4 µl de muestra y se diluyeron con 996 µl de agua milliQ, la lectura se realizó a una longitud de onda de 260 nm. El valor obtenido en la lectura se multiplicó por 10, el resultado es equivalente a concentración de RNA en mg/ml. Para verificar la presencia y calidad del RNA obtenido se hizo una electroforesis de éste en un gel de agarosa al 1% (Fig. 5).

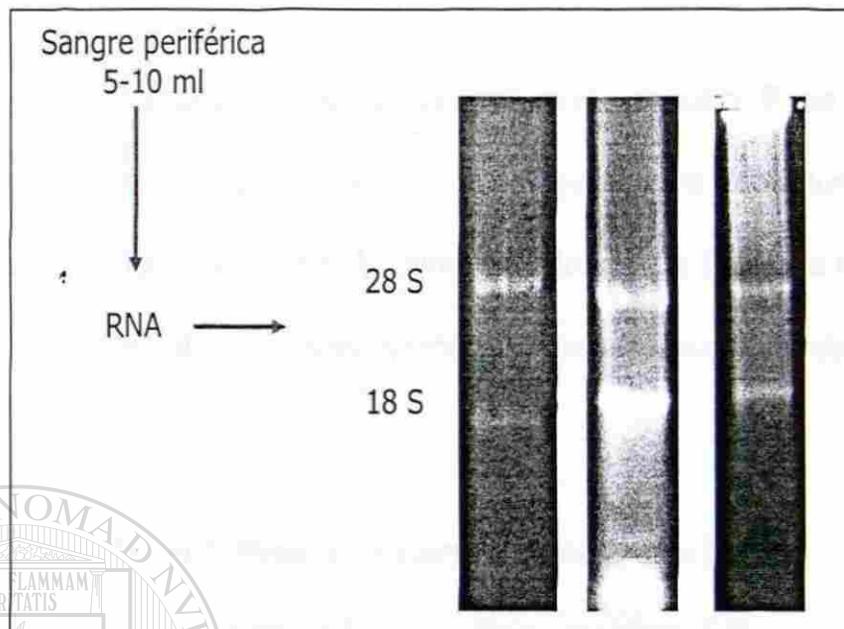


Fig. 5. RNA de pacientes con LLA. Se muestra en la figura el corrimiento electroforético de RNA en un gel de agarosa al 1%

3.2.6 Ensayo de retrotranscripción (RT)

Una vez realizada la extracción de RNA total y determinada su concentración se montó una reacción para sintetizar el DNAc, las condiciones de reacción se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de la reacción de RT

	Reactivo	Volumen (µl)
Tubo A	Buffer (5X)	2.0
	dNTPs (10 mM)	1.0
	DTT (100 mM)	1.0
	RNAsin (20 U/µl)	0.5
	BSA (10 mg/ml)	0.2
	MMLV-RT (2 U/µl)	0.2

	Agua milliQ estéril	3.1
Tubo B	RNA (1 µg/µl)	1.0
	Random primers (3 µg/µl)	1.0

Una vez montada la mezcla de reacción, el tubo B se sometió a desnaturalización a 65°C por 5 min, pasado el tiempo de desnaturalización el tubo se incubó en hielo por 2 min. El contenido de ambos tubos se mezcló y se sometió a la reacción de retrotranscripción utilizando el programa descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Programa para la reacción de RT

Temperatura °C	Tiempo (min)
25	10
42	60
70	15

3.2.7 Nivel de expresión del gen MDR-1, Ensayo Taqman ^{61,62,63}

Para realizar la cuantificación de la expresión del gen MDR-1, se realizó la amplificación por PCR de una región determinada del DNAc, utilizando un juego de iniciadores específicos y una sonda también específica, marcada en el extremo 5' con una molécula fluorescente llamada "reportero", y en el extremo 3', con otra molécula fluorescente llamada "apagador" de la molécula reportero (ensayo Taqman). En este ensayo cuando la Taq polimerasa alcanza el sitio de hibridación de la sonda durante la extensión de los iniciadores, digiere la sonda (actividad 5' exonucleasa) liberándose el reportero del apagador y la

fluorescencia que emite puede ser detectada y medida durante la fase de extensión de la PCR (Real Time). Mediante esta técnica se puede detectar el nivel de expresión del RNAm o DNAc expresados por el gen MDR-1 en las células de cada paciente LLA.

El RNA fue tratado con DNasa (RNase free DNase Kit, Ambion) y a partir de éste fue sintetizado el DNAc con un Kit de retrotranscripción (High Capacity DNAc Archive Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El RNAm fue cuantificado utilizando un ensayo de expresión génica (Assay on Demand Gene Expression kit Applied Biosystems, Foster City CA, USA) que incluía los iniciadores sin marcar, el reportero marcado Taqman (FAM) y la sonda MGM. La cuantificación se realizó utilizando el equipo de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, the USA). La secuencia del DNAc utilizada se obtuvo de la base de datos del banco de genes con número de

acceso M14758. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l conteniendo el DNAc, y cantidades optimizadas de los iniciadores de acuerdo a las condiciones especificadas por el fabricante del ensayo (1 \times Universal TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City CA, the USA). Los resultados de la expresión del RNAm del gen MDR-1 fueron normalizados utilizando como estándar el gen constitutivo de GAPDH (TaqMan Human Endogenous Control Reagents, Applied Biosystems).

3.2.8 Análisis de los polimorfismos del gen MDR-1(SNPs) por PCR-RFLPs⁶⁴

Para determinar los polimorfismos del gen MDR-1, como se mencionó anteriormente se sintetizó primero el DNAc mediante retrotranscripción a partir del RNA total obtenido de las células mononucleares de los pacientes. El tamaño del DNAc es de 4501 nucleótidos y para la búsqueda de los SNPs reportados en la secuencia codificadora se realizó primero una PCR utilizando juegos de iniciadores específicos para cada polimorfismo (tabla 6), los cuales fueron utilizados para amplificar por PCR los fragmentos correspondientes y posteriormente fueron analizados para detectar las variantes polimórficas mediante RFLPs (tabla 8).

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron utilizando las condiciones especificadas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de amplificación para los DNAc.

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de reacción 10X	2.5
Cloruro de Magnesio 25 mM	1.5
dNTPs 10 mM	0.5
Oligo 5 µM	2.0
Oligo 5 µM	2.0
Taq DNA polimerasa 5 U/µl (Epicentre)	0.25
DNAc	3.0
Agua milliQ Estéril	13.25

Una vez montada la mezcla de reacción, se sometió a amplificación utilizando un termociclador Perkin-Elmer 9700 y el programa mostrado en la tabla 7

Tabla 7. Programa de amplificación para distintos productos del DNAC del gen MDR-1

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1 Desnaturalización	94	2 min
2 Desnaturalización	94	30 s
3 Alineamiento	60	30 s
4 Extensión	72	30 s
35 ciclos regresando al paso 2		
5 Extensión	72	7 min

Para visualizar los productos amplificados de diferentes tamaños, se tomó una alícuota de la reacción y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, posteriormente se realizó una tinción con solución de bromuro de etidio y se analizó en el fotodocumentador Gel-Doc.

Los fragmentos amplificados fueron cortados durante 16 h a 37°C con enzimas de restricción específicas para cada polimorfismo estudiado (Tabla 8). Los fragmentos generados después de la digestión fueron separados en geles de agarosa al 3 % haciendo la tinción y el análisis de los resultados de la misma manera como se mencionó anteriormente.

Tabla 8. Secuencia de los iniciadores, enzimas de restricción y los fragmentos esperados para cada polimorfismo estudiado del gen MDR-1.

SNP	Secuencia del primer	Enzima de restricción	Fragmento, pb
Ex 02 A61G	5'-AGG AGC AAA GAA GAA GAA CTT TTT-3' 5'-GAT TCC AAA GGC TAG CTT GC-3'	<i>Taq I</i>	*317 **285, **32
Ex05 T307C	5'-AAT GGA GAC TAA AGA GTC ATA AAT G-3' 5'-ACC TGG TCA TGT CTT CCT CC-3'	<i>Ban II</i>	*104 **72, **32
Ex11 G1199A	5'-CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC-3' 5'-CCG TGA GAA AAA AAC TTC AAG G	<i>Eco 57I</i>	*52, *206 **258
Ex12 C1236T	5'-TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C 5'-CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG-3'	<i>Hae III</i>	*269, *62, *35 **269, **97
Ex21 G2677A	5'-TGC AGG CTA TAGGTT CCA GG-3' 5'-GTT TGA CTC ACC TTC CCA G-3'	<i>Bsr I</i>	*220 **206, **14
Ex26 C3435T	5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG 5'-AAG-3' GCA TGT ATG TTG GCC TC-3'	<i>Sau 3AI</i>	*158, *39 **197

* Fragmentos del alelo silvestre; **Fragmentos del alelo variante, Pb, pares de bases

3.2.9 Análisis estadístico

La diferencia entre las medias de los grupos y las variables continuas fueron evaluadas para la significancia estadística por ANOVA y con la prueba de Student-Neuwman-Keuls de dos colas.

Las variables discretas se analizaron mediante Chi-cuadrada y con Riesgo Relativo (RR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. La significancia estadística fue establecida para valores de $p < 0.05$. Los datos se reportaron en porcentajes, medias, desviaciones estándar, IC y RR. Todo el análisis se realizó usando un paquete estadístico comercial (GBSTAT versión 10.0 of Dynamic Microsystems, Inc., Copyright 2004).

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Características de los pacientes con LLA estudiados

En el presente estudio se incluyeron un total de 55 pacientes (26 mujeres y 29 hombres) con un promedio de edad de 18 años (rango, 4 – 57 años). De estos pacientes, 15 (25.4 %) sufrieron recaídas durante el tratamiento y 12 (21.8 %) fallecieron (Tabla 9).

Tabla 9. Características de los pacientes con LLA

Pacientes (n = 55)	n (%)
Sexo	
Masculino	29 (52.7)
Femenino	26 (47.3)
Edad (Años)	
Media	18
Rango	4-57
Respuesta Clínica	
Recaídas	15 (25.4)
No recaídas	40 (72.7)
Sobrevivientes	43 (78.2)
Fallecidos	12 (21.8)

4.2 Actividad de la proteína Gp-P

De acuerdo a la metodología descrita se incluyeron en el estudio de actividad 10 muestras de sujetos sin LLA, con el objetivo de estandarizar el bioensayo con rodamina 123 utilizada como sustrato; y se encontró un rango de actividad de la Gp-P de 48.4% - 68.3%, de estos individuos seis presentaron actividad baja de la Gp-P (48%-57%), cuatro actividad intermedia (58%-69%) y ninguno presentó actividad alta de la Gp-P (Fig. 6).

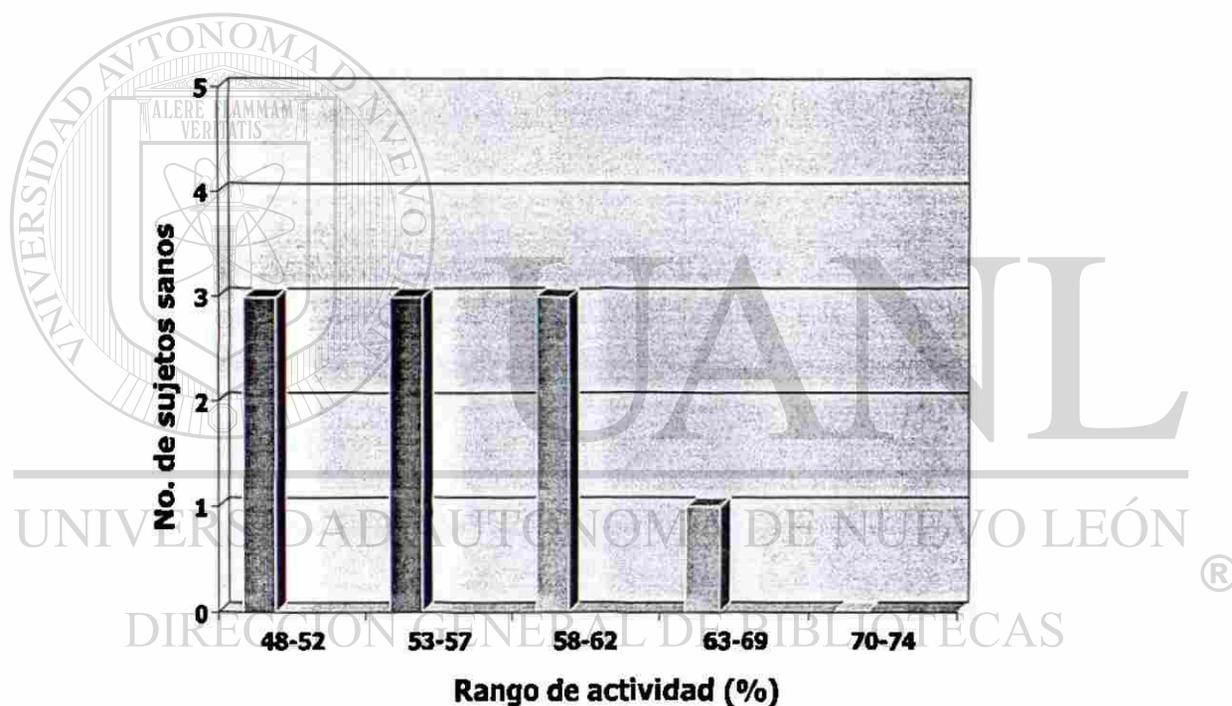


Fig. 6. Valores de actividad de la Gp-P. Se muestran los resultados de 10 muestras de sujetos sin LLA analizados mediante el bioensayo con rodamina 123

En los pacientes con LLA, el rango de actividad fue de 55% - 94%, mayor al encontrado en los sujetos sin LLA; de estos pacientes tres presentaron actividad baja de la Gp-P (55%-59%), siete actividad intermedia (60%-74%) y 45 actividad alta (75%-94%) (Fig. 7).

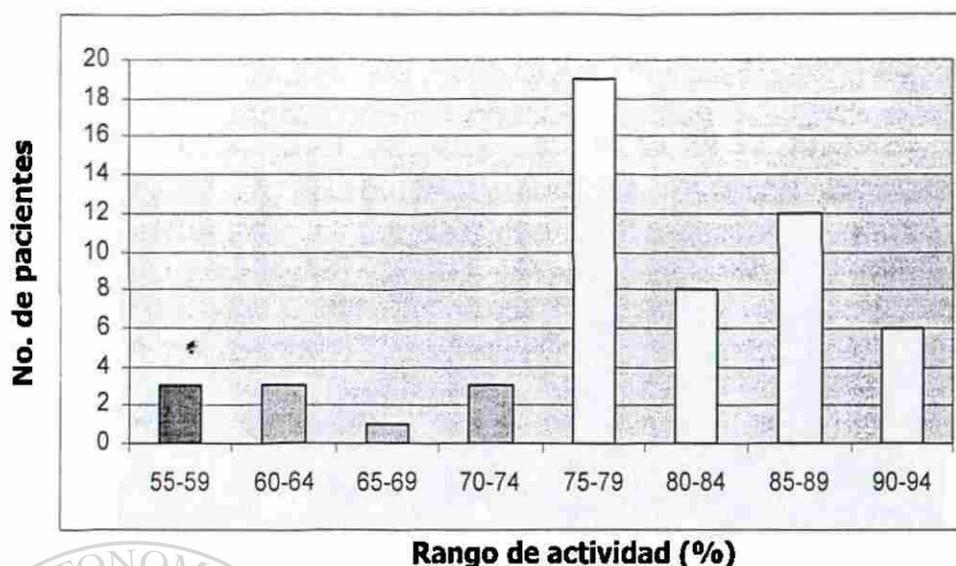


Fig. 7. Valores de actividad de la Gp-P. Se muestran los resultados de 55 muestras de pacientes con LLA analizados mediante el bioensayo con rodamina 123.

4.3 Frecuencia de los polimorfismos (SNPs) de la secuencia codificadora del gen MDR-1

A partir del DNAc de las células mononucleares de los pacientes, se hizo el análisis de seis polimorfismos por PCR-RFLPs. Los polimorfismos estudiados fueron el A61G del exon2, el T307C del exon 5, el G1199A del exon 11, el C1236T del exon 12, el G2677A del exon 21 y el C3435T del exon 26. Esto se hizo a partir de RNA debido a que se necesitaba determinar el nivel de expresión del gen MDR-1 y la cantidad de muestra de sangre obtenida de los pacientes era en ocasiones muy pequeña.

4.3.1 Frecuencia del polimorfismo (SNP) A61G.

Al hacer las digestiones del producto amplificado de 317 pb con la enzima de restricción *Taq I* (Fig. 8), se encontró que el 92.7 % de los

pacientes fueron homocigotos A/A normal, 7.3 heterocigoto A/G y no se observó ningún homocigoto mutado G/G para este SNP (Fig. 9).

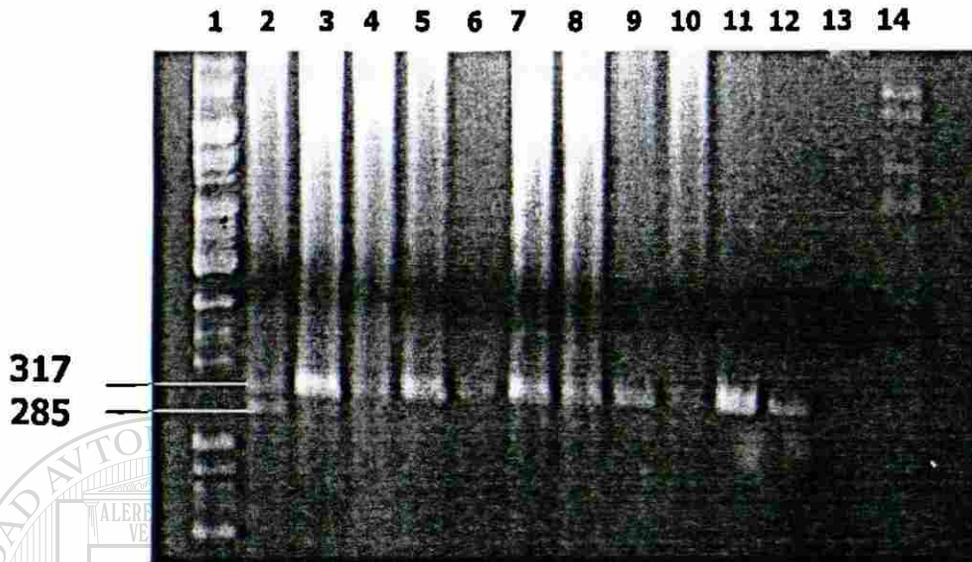


Figura 8. Digestiones con la enzima *Taq I* de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismo A61G. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en el Carril 1: Marcador pBS + *Msp I*; Carriles 2- 11: Producto amplificado de 317 pb digerido con *Taq I*; Las muestra que se observa en el carril 2 es heterocigoto y la de los carriles 3-11 son normales. Carril 12: Producto amplificado sin digerir. Carril13: pBabe sin digerir y en el carril 14 : Control de corte digerido con *Taq I*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

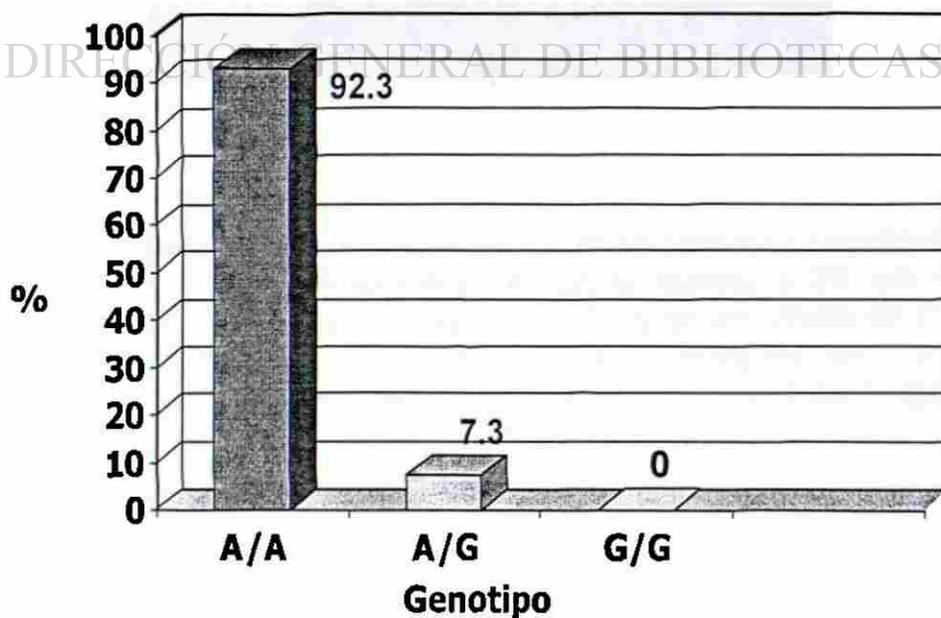


Fig. 9. Frecuencia del polimorfismo A61G en los pacientes con LLA

4.3.2 Frecuencia del polimorfismo (SNP) T307C

El producto amplificado de 317 pb obtenido para la identificación del SNP T307C fue digerido con la enzima *Ban* II (Fig.10). Para este polimorfismo encontramos que el 100% de los pacientes fueron homocigotos normales T/T (Fig. 11).

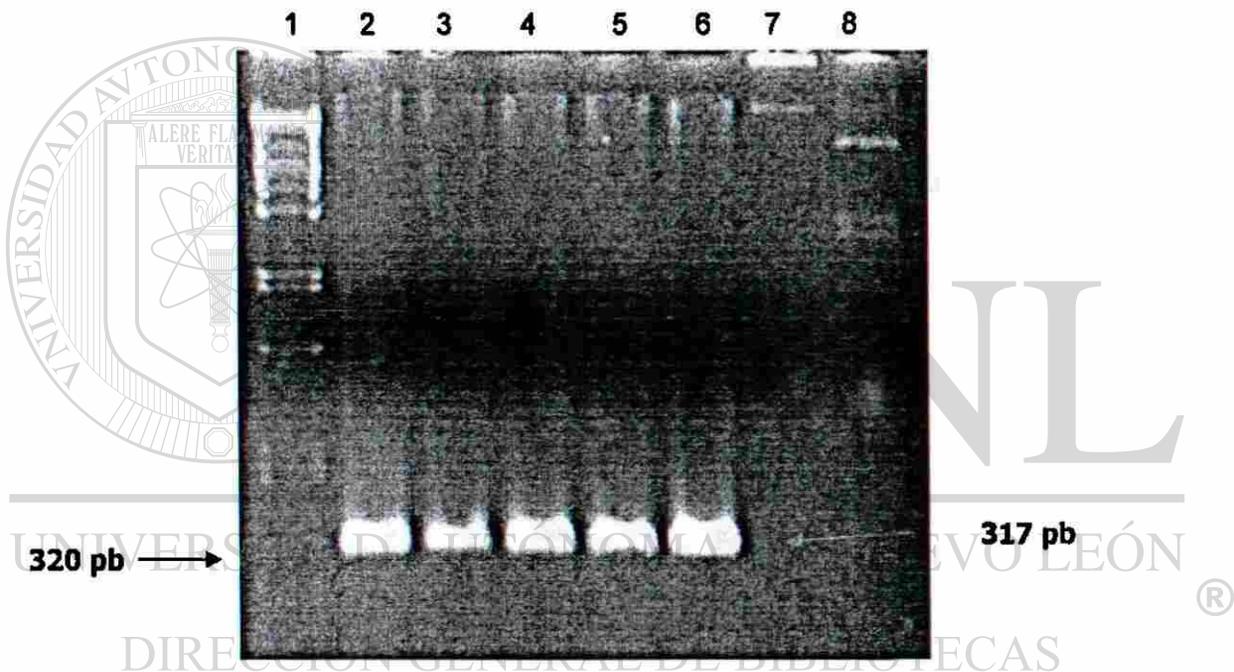


Figura 10. Digestiones con la enzima *Ban* II de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismo T307C. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en el Carril 1: Marcador pBS + *Msp* I; Carriles 2- 6: Producto amplificado de 317 pb digerido con *Ban* II. Las muestras que se observan son de pacientes con LLA homocigotos normales. Carril 7: pBabe sin digerir y en el carril 8: Control de corte digerido con *Ban* II.

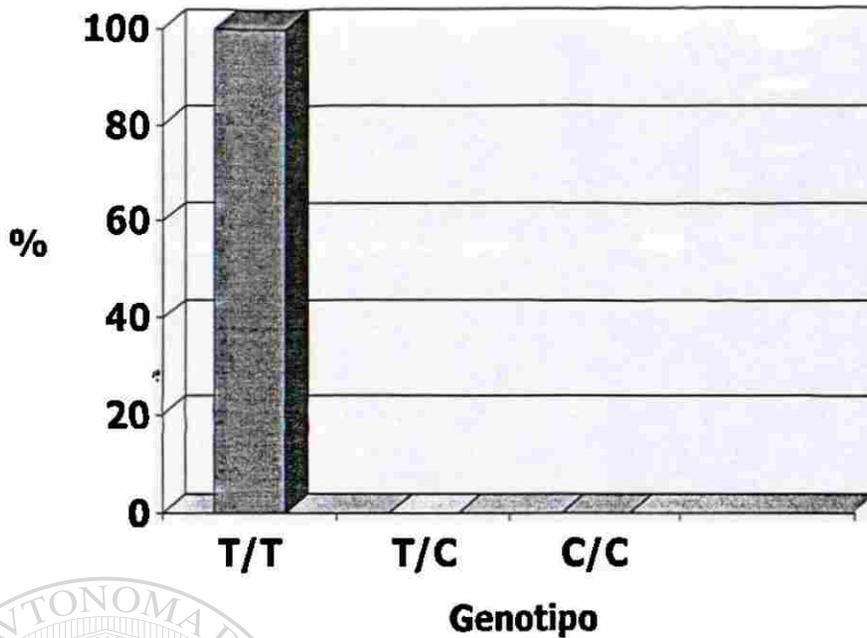


Fig. 11. Frecuencia del polimorfismo T307C en los pacientes con LLA

4.3.3 Frecuencia del polimorfismo (SNP) G1199A

Mediante el análisis de los resultados obtenidos después de la digestión con la enzima *Eco 57I* del producto amplificado de 258 pb para este polimorfismo (Fig. 12), se encontró que el 36.3% de los pacientes fueron homocigotos normales G/G, el 45.4% fueron heterocigotos G/A y el 18.1% homocigotos mutados (Fig. 13)

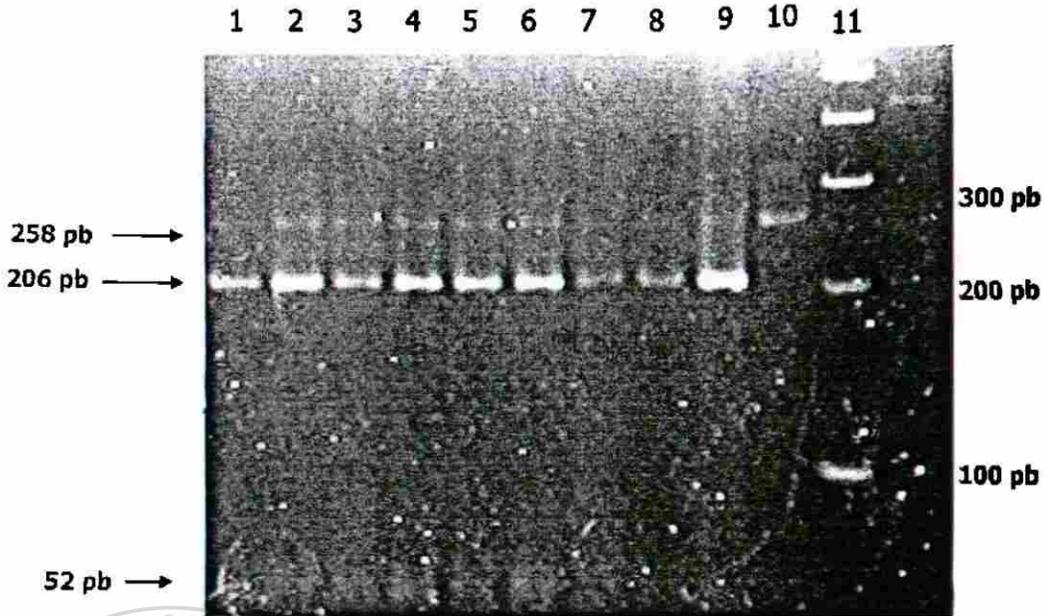


Figura 12. Digestiones con la enzima *Eco 571* de los productos amplificados de 258 pb del polimorfismo G1199A. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 10: Producto amplificado de 258 pb digerido con *Eco 571*. Carril 11: Marcador escalera de DNA de 100 pb. Las muestras que se observan en el carril 1-9 son heterocigotos; la muestra del carril 10 es homocigoto mutado.

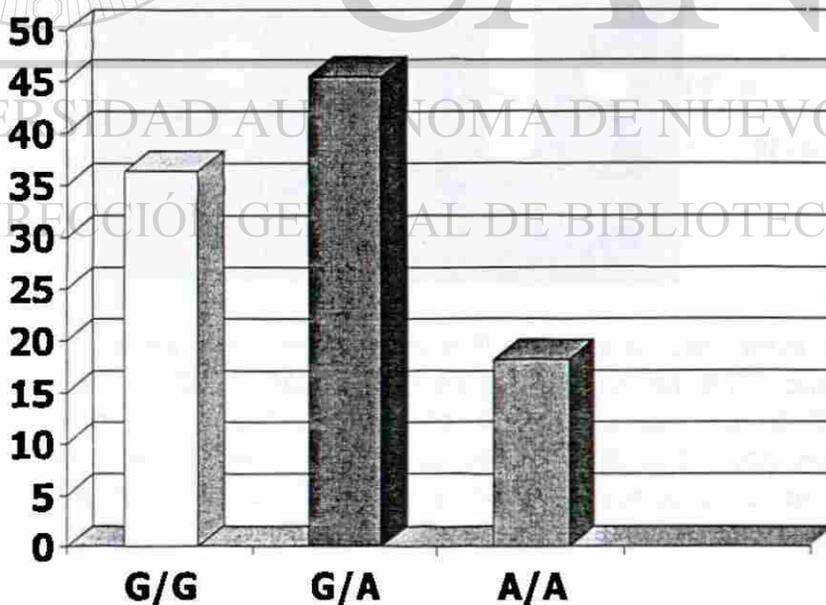


Fig. 13. Frecuencia del polimorfismo G1199A en los pacientes con LLA

4.3.4 Frecuencia del polimorfismo (SNP) C1236T

La frecuencia del polimorfismo C1236T fue determinado mediante la digestión del producto amplificado de 366 pb con la enzima *Hae* III (Fig. 14). La frecuencia encontrada en las muestras de los pacientes analizados fue de un 54.5% homocigoto normal C/C, 36.3% heterocigoto C/T y de un 9.0% homocigotos mutado T/T (Fig. 15)

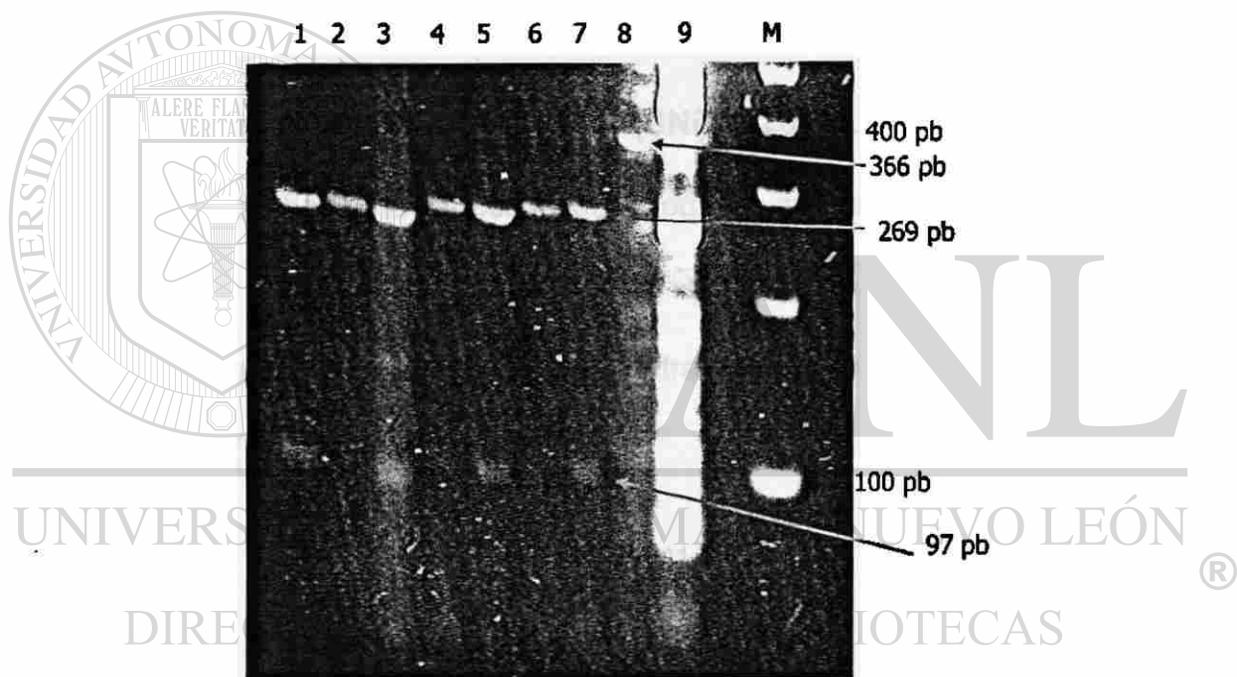


Figura 14. Digestiones con la enzima *Hae* III de los productos amplificados de 366 pb del polimorfismo C1236T. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 7: Producto amplificado de 366 pb digerido con *Hae* III. Carril 8: producto amplificado sin digerir. Carril 9: Control de corte digerido con *Hae* III. Carril M: Marcador escalera de DNA de 100 pb. Las muestras que se observan en el carril 1,3,5 y 7 son homocigoto mutado y las muestras del carril 2,4 y 6 son homocigoto normal.

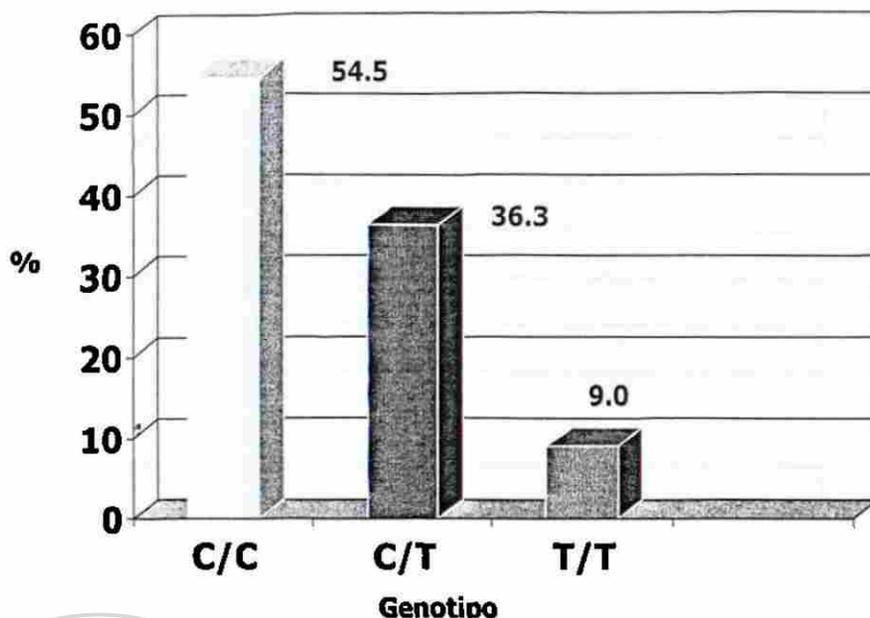


Fig. 15. Frecuencia del polimorfismo C1236T en los pacientes con LLA

4.3.5 Frecuencia del polimorfismo (SNP) G2677A

Después de hacer la digestión del producto amplificado de 220 pb con la enzima *Bsr* I (Fig. 16) encontramos que el 100% de los pacientes LLA eran homocigotos normales G/G, y no encontramos las otras variedades de este polimorfismo (Fig. 17).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

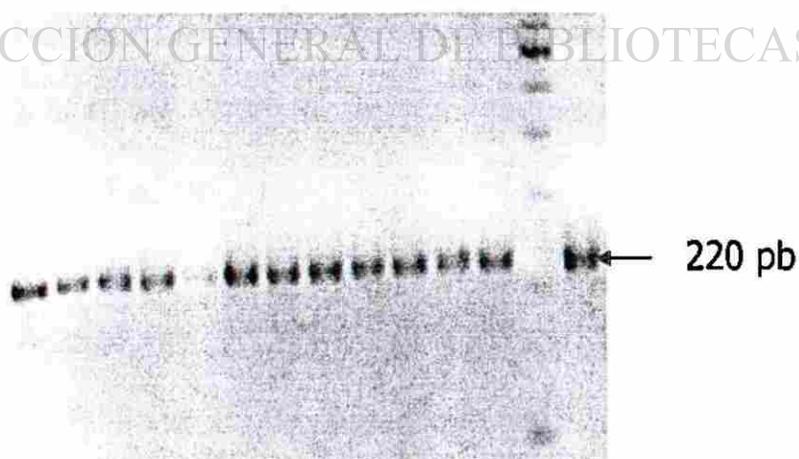


Figura 16. Digestiones con la enzima *Bsr* I de los productos amplificados de 220 pb del polimorfismo G2677A. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 12: Producto amplificado de 220 pb digerido con *Bsr* I. Carril 14: producto amplificado sin digerir. Carril 13: Marcador escalera de DNA de 100 pb. Las muestras que se observan son normales.

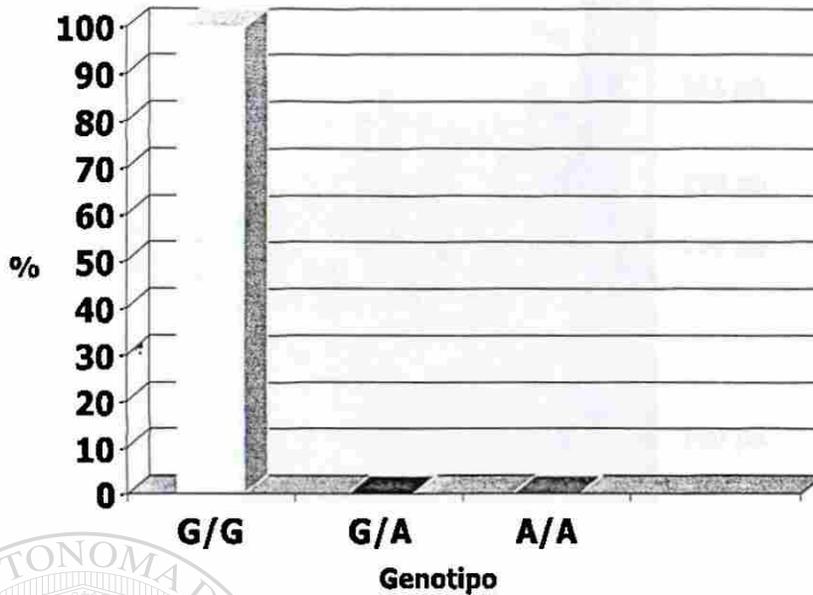


Fig. 17. Frecuencia del polimorfismo G2677A en los pacientes con LLA

4.3.6 Frecuencia del polimorfismo (SNP) C3435T

Para determinar la frecuencia del genotipo C3435T del exón 26 se hizo la digestión del producto amplificado de 197 pb con la enzima *Sau* 3AI (Fig.18) y se encontró que el 41.8 % (23/55) de los pacientes fueron homocigotos normales (C/C), el 10.9% (6/55) homocigotos mutados (T/T) y el 47.2% (26/55) heterocigotos (C/T) (Fig. 19).

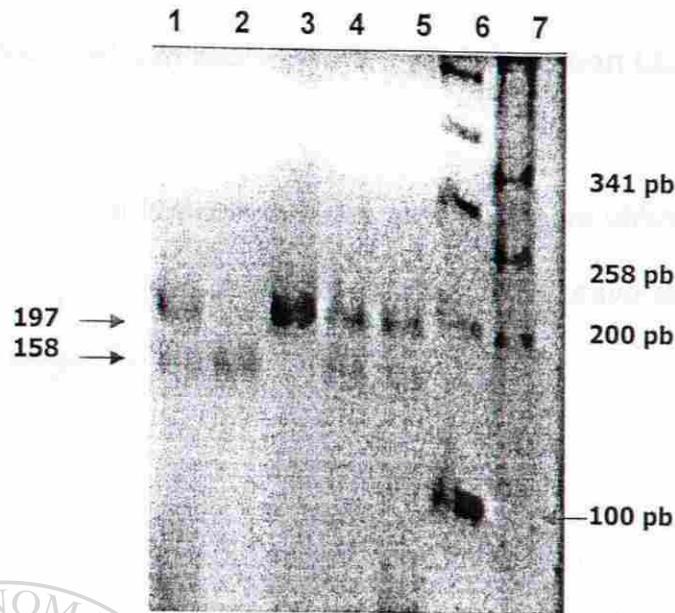


Figura 18. Digestiones con la enzima *Sau* 3AI de los productos amplificados de 197 pb del polimorfismo C3435T. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 5: Producto amplificado de 197 pb digerido con *Sau* 3AI. Carril 6: Marcador escalera de DNA de 100 pb. Carril 7: Control de corte digerido con *Sau* 3AI. Las muestras que se observan en el carril 1, 4 y 5 son heterocigotos; la muestra del carril 2 es homocigoto normal y la muestra del carril 3 es homocigoto mutado.

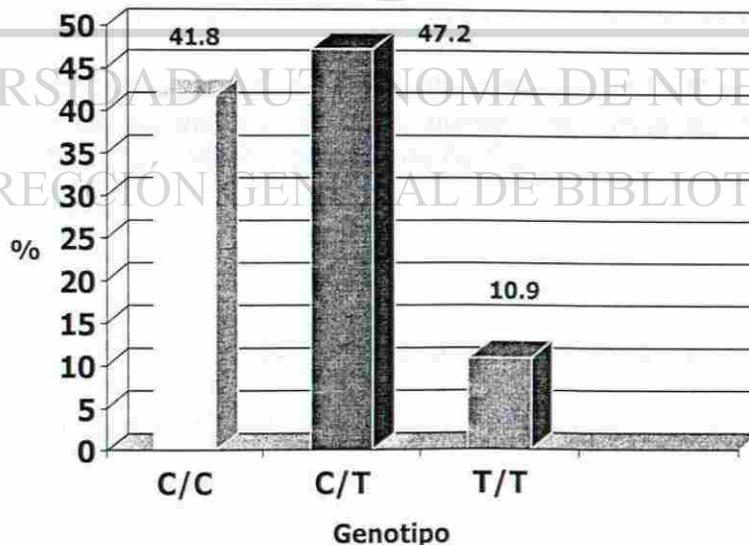


Fig. 19. Frecuencia del polimorfismo C3435T en los pacientes con LLA

4.4 Expresión del gen MDR-1 en los pacientes con LLA

Para determinar la expresión del gen MDR-1 se utilizó la técnica de PCR en Tiempo Real, y para normalizar y optimizar el ensayo se incluyó el análisis de expresión del gen GAPDH (Fig. 20).

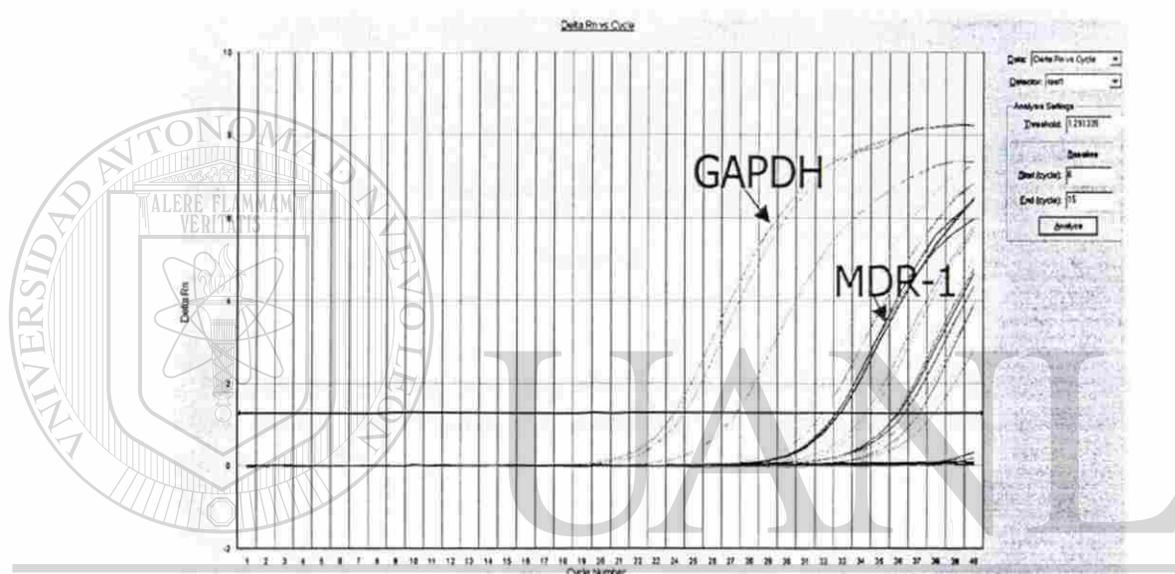


Fig. 20. Expresión del gen MDR-1 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real. Figura representativa de los valores de CT o número de ciclos en el que se detecta la expresión tanto del gen MDR-1 como el de GAPDH.

Encontramos variaciones en la expresión relativa del gen MDR-1 en cada uno de los pacientes. El valor más bajo de expresión observado es de 0.486 y el más alto es de 1.142. (Fig. 21).

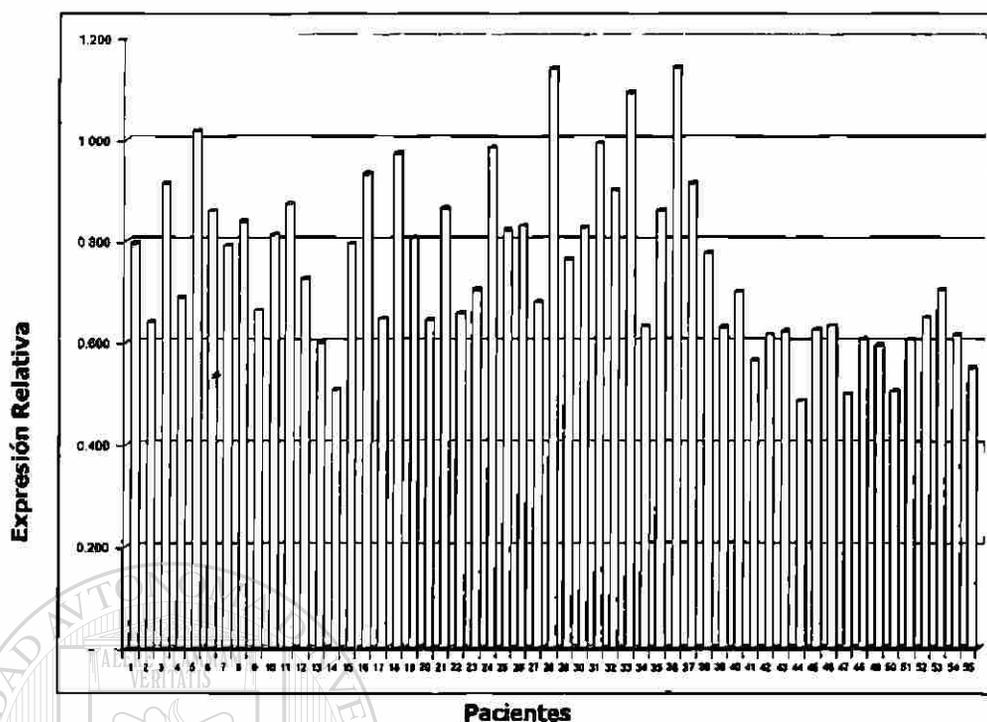


Fig. 21. Expresión relativa normalizada del gen MDR-1 en los pacientes con LLA. Se muestra los valores individuales de expresión de cada uno de los pacientes con LLA incluidos en el estudio.

Se mostrarán más adelante los resultados de la comparación entre la expresión y la presencia de los polimorfismos, ya que aunque la mayoría de los pacientes presentaron valores de expresión relativa intermedia y alta, éstos fueron únicamente significativos en pacientes con el polimorfismo C3435T y no se encontró significancia en pacientes con los otros SNPs.

4.5 Correlación entre la expresión y actividad de la Gp-P del gen MDR-1 y la presencia de los polimorfismos.

Se hizo la correlación de la expresión y actividad de la Gp-P del gen MDR-1 con respecto a la presencia de los polimorfismos C1236T, G1199A, A61G y

C3435T, ya que los pacientes analizados para los SNPs T307C y G2677A fueron homocigotos normales.

4.5.1 Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P con la presencia del polimorfismo C1236T.

Tanto la expresión como la actividad no presentaron diferencias significativas cuando fueron comparadas con las variantes alélicas C/C, C/T y T/T del polimorfismo C1236T (Fig. 22).

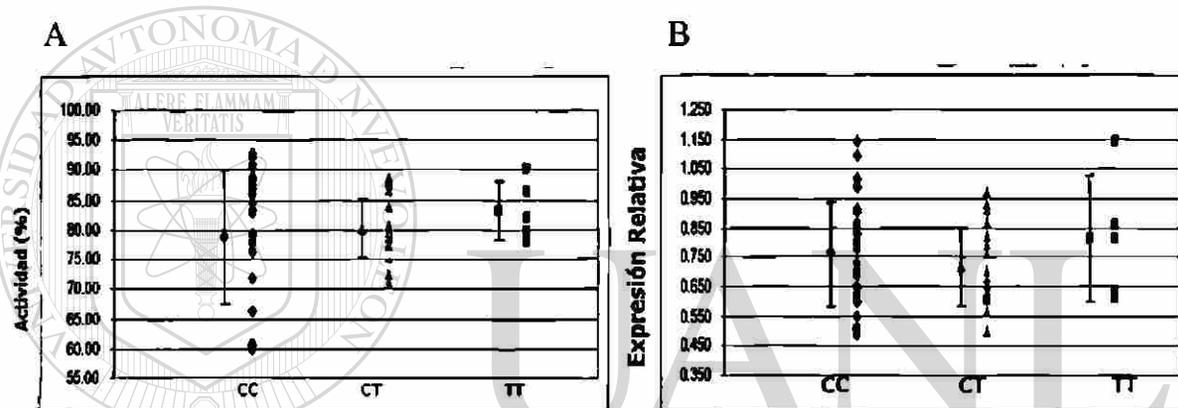


Fig.22. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C1236T y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 1236. (B), Resultados individuales de la expresión relativa del RNAm del gen MDR-1 en relación con diferentes genotipos del polimorfismo C1236T de 55 pacientes LLA, medido por PCR en Tiempo Real. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tanto para la expresión como para la actividad.

4.5.2 Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P con la presencia del polimorfismo G1199A

Para este polimorfismo no se encontraron diferencias significativas al relacionar la expresión relativa y la actividad de la Gp-P con las variantes alélicas G/G, G/A y A/A del polimorfismo G1199A. A pesar de no ser significativos los valores de expresión relativa entre los genotipos, para este

polimorfismo se observaron valores más altos en los pacientes con el genotipo normal G/G, valores intermedios en los heterocigotos y valores más bajos en los homocigotos mutados A/A (Fig. 23).

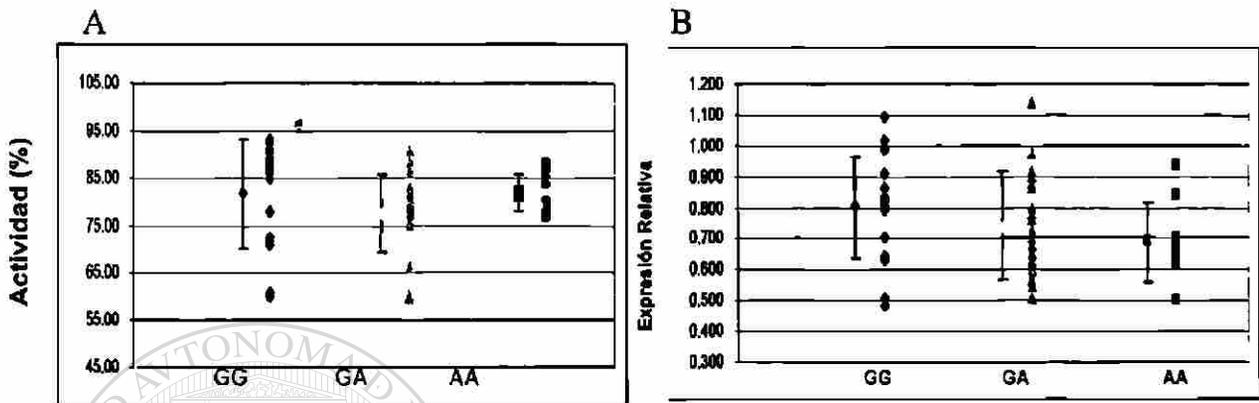


Fig.23. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo G1199A y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 1199. (B), Resultados individuales de la expresión relativa del RNAm del gen MDR-1 en relación con diferentes genotipos del polimorfismo G1199A de 55 pacientes LLA, medido por PCR en Tiempo Real. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tanto para la expresión como para la actividad.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.5.3 Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P con la presencia[®] del polimorfismo A61G

En este polimorfismo únicamente encontramos las variantes alélicas homocigoto normal A/A y heterocigoto A/T, las cuales al compararlas con la expresión relativa y la actividad de la Gp-P, no encontramos una correlación significativa (Fig. 24).

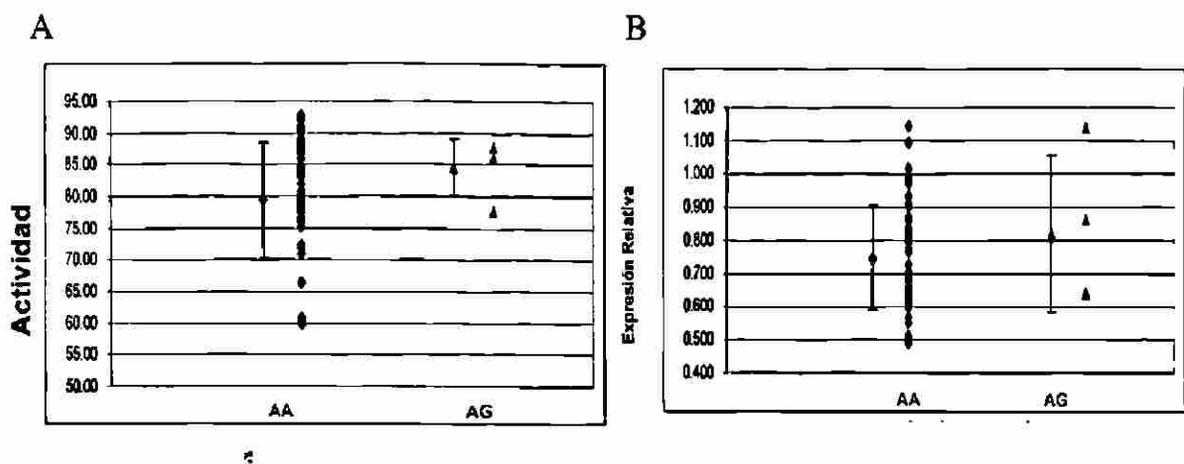


Fig.24. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo A61G y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 61. (B), Resultados individuales de la expresión relativa del RNAm del gen MDR-1 en relación con diferentes genotipos del polimorfismo A61G de 55 pacientes LLA, medido por PCR en Tiempo Real. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tanto para la expresión como para la actividad.

4.5.4 Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P con la presencia del polimorfismo C3435T

Mediante el ensayo de rodamina 123 se pudieron detectar diferencias significativas entre los valores de actividad de las células mononucleares de los pacientes con LLA con diferentes genotipos en el exón 26 del gen MDR-1. Los sujetos homocigotos C/C tuvieron una mayor actividad de la Gp-P que los sujetos homocigotos mutados TT ($P= 0.001$). Los sujetos heterocigotos presentaron valores intermedios de actividad. Con respecto a los valores de expresión relativa, no se encontraron diferencias significativas al comparar con los diferentes genotipos C3435T (Fig. 25).

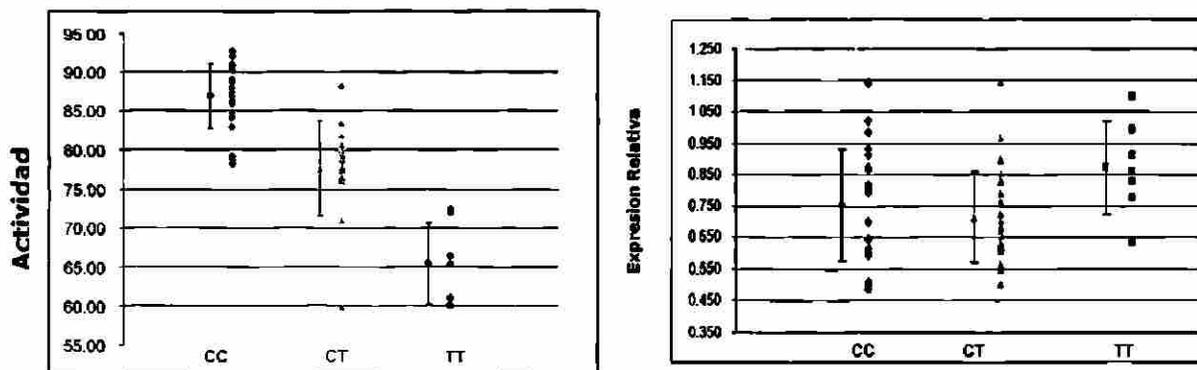


Fig.25. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C3435T y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 3435, $P = 0.001$. (B), Resultados individuales de la expresión relativa del RNAm del gen MDR-1 en relación con diferentes genotipos del polimorfismo C3435T de 55 pacientes LLA, medido por PCR en Tiempo Real. No se encontraron diferencias significativas de expresión relativa entre los grupos.

4.6 Relación entre el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y la respuesta clínica de los pacientes con LLA.

De acuerdo al análisis de la carga genética del polimorfismo C3435T del gen MDR-1 que se realizó a todos los pacientes LLA, encontramos que existe un factor de riesgo de 2.7 mayor de sufrir recaídas en aquellos que son homocigotos CC comparado con los pacientes CT/TT [$P = 0.029$ (RR, 95% CI 2.7, 1.1 – 7.0)] (Tabla 10). De estos pacientes, 15 (25.4 %) sufrieron recaídas durante el tratamiento y 40 (72.7 %) permanecieron estables (Tabla 9). Se hizo también el análisis de riesgo relativo entre los pacientes LLA homocigotos CC comparado con los pacientes CT/TT con respecto a la sobrevivencia considerando que 12 (21.8 %) fallecieron y 43 (78.2) sobrevivieron durante el presente estudio (Tabla 9). Además se encontró con el análisis estadístico que

los pacientes CC presentaron un riesgo relativo de 2.7 veces mas de fLLAecer [P = 0.060 (RR, 95% CI 2.7, 0.9 -8.1)] comparado con los que fueron CT/TT, aunque la diferencia no fue significativa (Tabla 10).

Tabla 10. Relación entre el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y la respuesta clínica de los pacientes con LLA

Pacientes LLA (n = 55)	Genotipo CC (%)	Genotipo CT/TT (%)	RR (IC 95%)	Valor de P
Recaídas	10 (18.3)	5 (9.2)	2.7 (1.1 – 7.0)	0.029
No Recaídas	13 (23.3)	27 (49.2)		
Sobrevivientes	15 (27.2)	28 (50.9)	2.7 (0.9 -8.1)	0.06
Fallecidos	8 (14.6)	4 (7.3)		

CAPITULO V

DISCUSION

El gen MDR-1 humano está compuesto por 28 exones y los polimorfismos fueron identificados por primera vez por Kioka y colaboradores mediante estudios *in vitro* en células cancerosas⁶⁵, subsecuentemente otros grupos, entre los que se incluye a Hoffmeyer y colaboradores⁴⁶ han realizado un estudio completo de toda la región codificante del gen. La mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo en sujetos voluntarios sanos caucásicos, asiáticos, africanos, etc, y existen diferencias importantes en las frecuencias alélicas debido a las diferencias étnicas, como es el caso del SNP C3435T del exón 26 que se ha observado más frecuentemente en las poblaciones africanas y caucásicas⁶⁶; el genotipo G2677A del exón 21 que es más común entre la población japonesa^{67,68}; el SNP C1236T más frecuente en sujetos asiáticos y caucásicos y la variante 1236T que se ha detectado más en los asiáticos que en los caucásicos. Con esto se ha demostrado ampliamente que la frecuencia y combinaciones de haplotipos del gen MDR-1 es diferente entre las poblaciones⁶⁹.

A partir de que se reportó que el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 está asociado con cambios en la expresión y función de la Gp-P⁴⁴, la gran mayoría de los estudios se han enfocado sobre este polimorfismo sinónimo ya que no provoca cambio de aminoácido en la proteína. El estudio de Hoffmeyer

fue el primero en el que se reportó la reducción de dos veces la expresión de la Gp-P en muestras de duodeno de sujetos caucásicos sanos, cuando portaban el alelo 3435T y esto fué asociado a altos niveles de digoxina plasmática. Estos resultados fueron confirmados por Johne⁷⁰, Verstuyft⁷¹, Kurata⁷² y colaboradores. Sin embargo estas observaciones no concuerdan con lo reportado por Gerloff y colaboradores⁷³ quienes no encontraron diferencias significativas en los niveles de digoxina al comparar sujetos caucásicos sanos con el alelo 3435T y 3435C. Por otro lado Nakamura y colaboradores⁷⁴ cuantificaron el RNAm del gen MDR-1 a partir de muestras de duodeno y encontraron niveles elevados en sujetos japoneses con el alelo 3435T al compararlos con sujetos 3435C, resultados que también son contrarios a los encontrados por Hoffmeyer y colaboradores. La controversia no se limita a poblaciones asiáticas, en un estudio realizado en sujetos caucásicos sanos por Siegmund y colaboradores, ellos no encontraron influencia de este polimorfismo sobre la expresión de la Gp-P. De la misma manera van der Heiden y colaboradores⁷⁵ trabajando con células de médula ósea de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda no encontraron diferencias tanto en la actividad como en la expresión de la Gp-P. Los mismos resultados fueron obtenidos por Tanabe y colaboradores pero con muestras de placentas⁷⁶. Por lo anteriormente descrito es claro que hay mucha controversia en el efecto del polimorfismo C3435T y la actividad de la Gp-P.

La presencia del polimorfismo C3435T es de gran relevancia en otras enfermedades, como en el cáncer de mama donde los pacientes con el

genotipo T/T presentan una mayor respuesta a la quimioterapia⁷⁷, en la epilepsia donde los pacientes responden mejor al tratamiento cuando tienen el genotipo T/T⁷⁸, de la misma manera los pacientes con HIV responden mejor con el mismo genotipo T/T⁷⁹, y esto se ve reflejado en la cuenta de células CD4+. Es importante mencionar que aunque existen discrepancias en la mayoría de los estudios reportados, se considera la relevancia funcional de este polimorfismo C3435T a nivel del RNAm, de la proteína Gp-P o de la actividad de la misma en diversos tejidos. La pregunta sigue estando presente, en cuanto a como este polimorfismo puede influenciar sobre la expresión y actividad de la Gp-P ya que como ya se mencionó es silencioso (Ile142Ile). Se postula que puede estar relacionado con otro polimorfismo, o bien que podría depender de la estabilidad del RNAm, o de algún cambio a nivel del promotor del gen, presencia de potenciadores o variaciones en el procesamiento del RNAm⁴⁴.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el presente trabajo se evaluó la influencia de seis polimorfismos de la secuencia codificadora del gen MDR-1 sobre la expresión del RNAm y la actividad de la Gp-P en pacientes con LLA. Los SNPs que se analizaron fueron el A61G del exón 2, el T307C del exón 5, el G1199A del exón 11, el C1236T del exón 12, el G2677A del exón 21 y el C3435T del exón 26. Para el polimorfismo A61G encontramos una frecuencia del 92.7% de homocigotos normales A/A, un 7.3% de heterocigotos y no se detectó el alelo G/G; en el análisis del T307C todos los pacientes fueron T/T homocigotos normales; para el G1199A se

obtuvo una frecuencia de 36.3% G/G, 45.4% G/A y 18.1 G/G; para el polimorfismo C1236T encontramos una frecuencia del 54.5% del alelo C/C, 36.3% del C/T y 9.0% del T/T; para el SNP G2677A todas las muestras analizadas fueron G/G homocigotos normales. Se analizó también la frecuencia del polimorfismo C3435T en los pacientes y se encontró que el 41.8 % (23/55) de ellos fueron homocigotos normales (C/C), el 10.9% (6/55) homocigotos mutados (T/T) y el 47.2% (26/55) heterocigotos (C/T).

De los seis polimorfismos estudiados, sólo se encontró diferencia significativa para el caso de la actividad de la Gp-P en los pacientes que portaban el polimorfismo C3435T, de los cuales, los que tenían el alelo C/C presentaron una mayor actividad de la Gp-P al ser comparados con los del alelo T/T; los portadores del alelo heterocigoto C/T tuvieron valores intermedios de actividad. Estos resultados son similares a los encontrados por Hitzl y colaboradores⁵⁸ quienes trabajaron con células CD 56+ de sujetos caucásicos y encontraron mayor actividad de la Gp-P en los sujetos con el alelo C/C comparados con los que tenían el alelo T/T utilizando también el mismo ensayo con rodamina 123. Otros estudios no han encontrado diferencias en la actividad, por ejemplo van der Heiden y colaboradores⁸¹, igualmente, Calado y colaboradores⁸⁰ no encontraron diferencias de actividad en células CD 34+ de voluntarios sanos y Tanabe y colaboradores⁸² en placenta, tampoco encontraron diferencias al comparar los diferentes alelos del polimorfismo C3435T del gen MDR-1.

Debido a la importancia que se le ha dado al polimorfismo C3435T y en base a los resultados significativos que encontramos con respecto a la actividad, también analizamos si existía alguna influencia de las variantes alélicas de este SNP sobre la respuesta clínica de los pacientes con LLA estudiados, y encontramos que existe 2.7 veces más riesgo de sufrir recaídas en aquellos que son homocigotos CC comparados con los pacientes CT/TT [P = 0.029 (RR, 95% CI 2.7, 1.1 – 7.0)]. Se hizo también el análisis de riesgo relativo entre los pacientes CC comparado con los pacientes CT/TT con respecto a la supervivencia y se encontró que los pacientes CC presentaron un riesgo relativo de 2.7 veces más de fallecer [P = 0.060 (RR, 95% CI 2.7, 0.9 - 8.1)] comparado con los que fueron CT/TT, aunque la diferencia no fue significativa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos recientemente por Jamroziak y colaboradores⁶⁰ quienes publicaron que el polimorfismo C3435T está involucrado tanto en la susceptibilidad como en la respuesta clínica de pacientes caucásicos con LLA; de acuerdo al estudio realizado por estos autores los pacientes portadores del genotipo T/T tienen más riesgo de desarrollar LLA que los otros individuos, mientras que los pacientes con el genotipo CC presentan un mal pronóstico.

Siegmund y colaboradores⁸¹ realizaron un estudio con 212 pacientes y 567 sujetos sanos y encontraron una correlación entre un mayor riesgo de desarrollar tumor renal en pacientes con el genotipo C/T y T/T. En otro estudio pero trabajando con pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, Ilmer y colaboradores⁸² encontraron que los pacientes con el genotipo C/C presentaron

un menor tiempo de sobrevida comparado con los que tienen los otros genotipos C3435T del gen MDR-1. Efferth y colaboradores⁸³ no encontraron diferencias significativas en la sobrevida de pacientes con LLA con los diferentes genotipos C3435T.

Nosotros encontramos que los pacientes C/C presentaron un riesgo relativo de 2.7 veces mas de fallecer [$P = 0.060$ (RR, 95% CI 2.7, 0.9 -8.1)] comparado con los que fueron CT/TT (aunque la diferencia no fue significativa).

Este es el primer estudio realizado en México en el que se analizó la participación del gen MDR-1 en pacientes con LLA y se correlacionó los niveles de actividad con la respuesta a la quimioterapia.

Es importante considerar que para entender el mecanismo de modulación del gen MDR-1 es necesario evaluar la actividad y expresión de la Gp-P producto del gen, aplicando estudios de correlación genotipo-fenotipo con un mayor número de muestras y aparearlos con muestras control, con la finalidad de incrementar el conocimiento entre la presencia de los SNPs , la respuesta clínica y el pronóstico de los pacientes que dependen de tratamientos en los que los medicamentos son sustratos naturales de la Gp-P.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Se evaluaron seis polimorfismos de la secuencia codificadora del gen MDR-1 en pacientes con LLA. Los SNPs fueron el A61G del exón 2, el T307C del exón 5, el G1199A del exón 11, el C1236T del exón 12, el G2677A del exón 21 y el C3435T del exón 26.

- Sólo se encontró diferencia significativa para el caso de la actividad de la Gp-P en los pacientes que portaban el polimorfismo C3435T, de los cuales, los que tenían el genotipo C/C presentaron una mayor actividad al ser comparados con los del genotipo T/T.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- Debido a la importancia que se le ha dado al polimorfismo C3435T y en base a los resultados significativos que encontramos con respecto a la actividad, se observó que existe 2.7 veces más riesgo de sufrir recaídas en aquellos pacientes con LLA que son homocigotos CC comparados con los pacientes CT/TT.

BIBLIOGRAFIA

1. Salmon SE and Bertino JR, Principles of cancer therapy. En: Bennett TC and Plum F, eds. Cecil textbook of medicine. 20 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996; Vol 1:103-49.
2. Booser DJ, Hortobagyl GN. Anthracycline antibiotics in cancer therapy. *Drugs* 1994; 47: 223-58
3. De Vita Jr VT. Principles of chemotherapy. In: VT De Vita Jr.S, Hellman S.A. Resenberg JB. Lippincott Co, editors. *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. 3rd ed. Philadelphia, USA; 1989.
4. Young R. Mechanisms to improve chemotherapy effectiveness. *Cancer* 1990; 65: 815-22.
5. Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, et al. Clinical trials of modulation of multidrug resistance, pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer* 1993; 72: 3502-14.
6. Roepe PD. What is the precise role of human MDR-1 protein in chemotherapeutic drug resistance. *Curr Pharm Des* 2000; 6: 241-60
7. Schimke RT. Methotrexate resistance and gene amplification, mechanisms and implications. *Cancer* 1986; 57: 1912-7.
8. Brian LJ, Dalton W, Fisher GA, Sikic BI. Reversal of multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Cancer (supl.)* 1993; 72: 3484-8.
9. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 1-6
10. Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 1993 Feb 15;53(4):747-54.
11. Ambudkar S, Dey S, Hrycyna C, Ramachandra M, Pastan I and Gottesman M. Biochemical, Cellular and Pharmacological Aspect of the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Pharmacolo. Toxicol.* 1999. 39: 361-98
12. Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann U.A and Pastan I. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev Genet.* 1995. 29:607-49
13. Gottesman MM and Pastan I. Drug resistance: alterations in drug uptake or extrusion. In *Encyclopedia of cancer*. 1996 Ed. JR Bertino, pp. 549-

59. San Diego, CA: Academic.
14. Perez RP, Hamilton TC, Ozols RF, Young RC. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* 1993;71: 1571- 80.
15. Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65: 95-106
16. Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, et al. Clinical trials of modulation of multidrug resistance, pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer* 1993; 72: 3502-14.
17. Sharma V, Beatty A, Wey SP, et al. Novel gallium(III) complexes transported by MDR-1 P-glycoprotein: potential PET imaging agents for probing P-glycoprotein-mediated transport activity in vivo. *Chem Biol* 2000; 7: 335-43.
18. Slovak ML, Coccia M, Meltzer PS, Trent JM. Molecular analysis of two human doxorubicin-resistant cell lines: evidence for differing multidrug resistance mechanisms. *Anticancer Res* 1991; 11: 423-8.
19. Masters JR. Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiother Oncol* 1990; 19: 297-305.
20. Juliano RL and Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta*. 1996. 455:152-162.
-
21. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman M and Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR-1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*. 1986; 47: 381-389.
22. Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM and Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*. 1996. 323:728-731
23. J. Smit, A. Schinkel, et al.. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993 Nov; 75(3):451-62
24. J. Smit, A. Shinkel, et al.. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest* 1994 Nov; 71(5):638-49
25. Bernard, J., Da Silva, J., Tessier, J. R. and Riou, G. Overexpression of MDR-1 gene with no DNA amplification in a multiple drug resistance human ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 1985; 43: 201-208

26. Shen, D.W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, L. and Gottesman, M. M. Human multidrugresistant cell lines: increase MDR-1 expression can precede gene amplification. *Science* 1986; 232: 643-645
27. Ueda, K., Claek, P. D., Chen, C. J., Roninson, I. B., Gottesman, M. M. and Pastan, I. The human multidrugresistance (MDR-1) gene: DNACloning and transcription initiation. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262: 505-508
28. Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M. Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrugresistance gene. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262: 17432-17437
29. Harris AL, Hochhauser D. Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncologica* 1992; 31: 205-13
30. T. Loo and D. Clarke. The Transmembrane Domains of the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein Are Sufficient to Mediate Drug Binding and Trafficking to the Cell Surface. *J Biol Chem* 1999 Aug; 274(35):24759-65.
31. Booth CL, Pulaski L, Gottesman MM, Pastan I. Analysis of the properties of the N-terminal nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein. *Biochemistry* 2000; 39: 5518-26.
32. Nuti SL, Mehdi A, Rao US. Activation of the human P-glycoprotein ATPase by trypsin. *Biochemistry* 2000; 39: 3424-32
-
33. Azzaria M, Schurr E, Gros P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the MDR-1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5289-97
34. Roninson IB. The role of the MDR-1 (P-Glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 95 - 102
35. Biedler JL. Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer* 1992; 70:1799-809.
36. Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim et Biophys Acta* 1988; 948: 87-128.
37. Kast C, Canfield V, Levenson R, Gros P. Membrane topology of Pglycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3. *Biochemistry* 1995; 34: 4402 - 11.

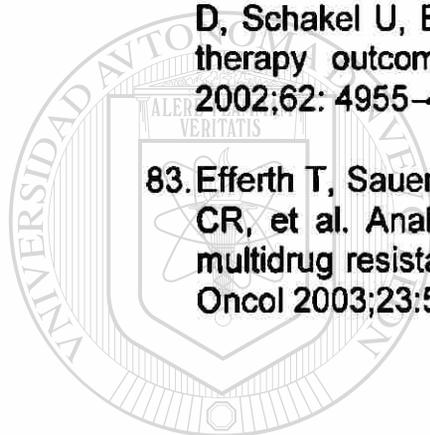
38. Masters JR. Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiother Oncol* 1990; 19: 297-305
39. Catia Marzolini, PharmD, PhD, Erik Paus, PharmD, MS, Thierry Buclin, MD, and Richard B. Kim, MD. Polymorphisms in human *MDR-1* (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75:13-33.
40. Brian LJ, Dalton W, Fisher GA, Sikic BI. Reversal of multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Cancer (supl.)* 1993; 72: 3484-8
41. Tunggal JK, Melo T, BLLAinger JR, Tannock IF. The influence of expression of P-glycoprotein on the penetration of anticancer drugs through multicellular layers. *Int J Cancer* 2000; 86: 101-7.
42. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 137-71.
43. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 265-9.
44. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one LLAEle with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-8.
45. Slapak CA, Fracasso PM, Martell RL, et al. Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in vincristine but not doxorubicin-selected multidrug resistant murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* 1994; 54: 5607-13.
46. Abe T, Hasegawa SW, Taniguchi K, et al. Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int J Cancer* 1994; 58: 860-4.
47. Muller M, Meijer C, Zaman GJ, et al. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 13033-7.
48. Beck J, Niethammer D, Gekeler V. High *MDR-1*- and *mrp*-, but low topoisomerase II alpha-gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Lett* 1994; 86: 135-42.
49. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-

- glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7735-8.
50. De Gregorio MW and Pérez EA. Molecular mechanisms of drug resistance. En: Bennett TC, Plum F, eds. *Cecil textbook of medicine*. 20 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996; vol 1:1056-60.
51. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 1998; 251: 252-261.
52. van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P and Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38: 94-110.
53. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM and Pastan I. Expression of a full length DNA for the human 'MDR-1' gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3004-3008.
54. Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, Bates SE and Fojo T. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood*. 1998; 91: 1749-1756.
55. Baldus C, Fietz T, Rieder H, Schwartz S, Thiel E and Knauf W. MDR-1 expression and deletions of chromosomes 7 and 5 (Q) separately indicate adverse prognosis in AML. *Leuk lymphoma*. 2001; 40 (5-6): 613-23.
-
56. Rund D, Azar I and Shperling O. A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR-1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 457:71-5.
57. Krzysztof Jamrozik, Wojciech Mlynarski, Ewa Balcerczak, Magda Mistygacz, Joanna Trelinska, Marek Mirowski, Jerzy Bodalski, Tadeusz Robak. Functional C3435T polymorphism of *MDR-1* gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *European Journal Of Haematology* 2004;72; (5): 314
58. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. The C3435T mutation in the human MDR-1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11: 293-298.

59. Lee J, Paull K, Alvarez M, Hose C, Monks A, Grever M, Fojo AT and Bates SE. Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen. *Molecular Pharmacol.* 1994; 46: 627-638
60. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9
61. Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfond DH. Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus Aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1991. 88:7276-7280.
62. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992. 10:413-417
63. Higuchi R, Focker C, Dollinger G and Watson R. Kinetic PCR: Real Time Monitoring of DNA Amplification reactions. *Biotechnology.* 11:1026-1030
64. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR-1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar; 69(3):169-74. Erratum in: *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jan;75(1):124.
65. Kioka N, Tsubota J, Kakehi Y, Komano T, Gottesman MM, Pastan I, et al. P-glycoprotein gene (MDR-1) DNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:224- 31.
66. Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, et al. C3435T polymorphism in the MDR-1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Gp-P in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002;12:451-7.
67. Tamura T, Aoyama N, et al. Significant genetic linkage of MDR-1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res* 2002;19:1581-5.
68. Tamura T, Aoyama N, et al. Effects of polymorphisms of MDR-1, MRP1, and MRP2 genes on their RNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1356-9.

69. Tang K, Ngoi S, Gwee P, Chua J, Lee E, Chong S, et al. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR-1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 2002;12:437-50.
70. John A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, et al. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR-1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:584-94.
71. Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Kerb R, Brinkmann U, Jaillon P, et al. Digoxin pharmacokinetics and MDR-1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;58:809-12.
72. Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, et al. Role of human MDR-1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:209-19.
73. Gerloff T, Schaefer M, John A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I, et al. MDR-1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54: 610-6.
74. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR-1 gene on expression level of MDR-1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:297-303.
75. van der Heiden IP, van der Heuvel MM, Wiemer E, Pieters R, Lindemans J, van der Anker J, et al. MDR-1 C3435T gene polymorphism does not correlate with P-gp expression and function in acute myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:58.
76. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1137-43.
77. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locLLAy advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2003;22:1117-21.
78. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003;348:1442-8.

79. Fellay J, Marzolini C, Meaden E, Back D, Buclin T, Chave J, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with LLaelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359:30-6.
- 80.¹ Calado RT, Falcao RP, Garcia AB, Gabellini SM, Zago MA, Franco RF. Influence of functional MDR-1 gene polymorphisms on P-glycoprotein activity in CD34+ hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2002;87: 564-8.
81. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, Cascorbi I. The effects of the human MDR-1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72: 572-583.
82. Illmer T, Shuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gothard S, Freund D, Schakel U, Ehninger G, Shaich M. MDR gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 2002;62: 4955-4962.
83. Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, Gebhart E, Drexler HG, Chitambar CR, et al. Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR-1 in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol* 2003;23:509-17.

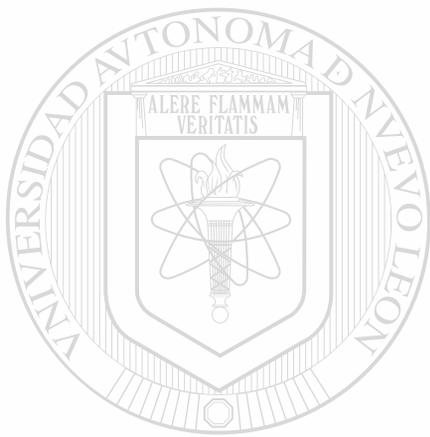


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



100