

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).

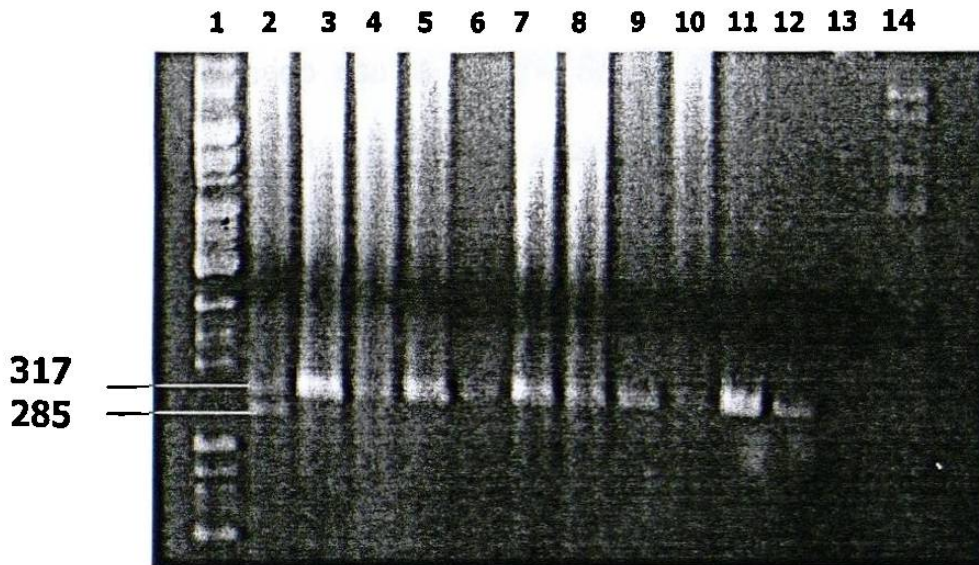


Figura 8. Digestiones con la enzima *Taq I* de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismo A61G. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en el Carril 1: Marcador pBS + *Msp I*; Carriles 2- 11: Producto amplificado de 317 pb digerido con *Taq I*; Las muestra que se observa en el carril 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*.

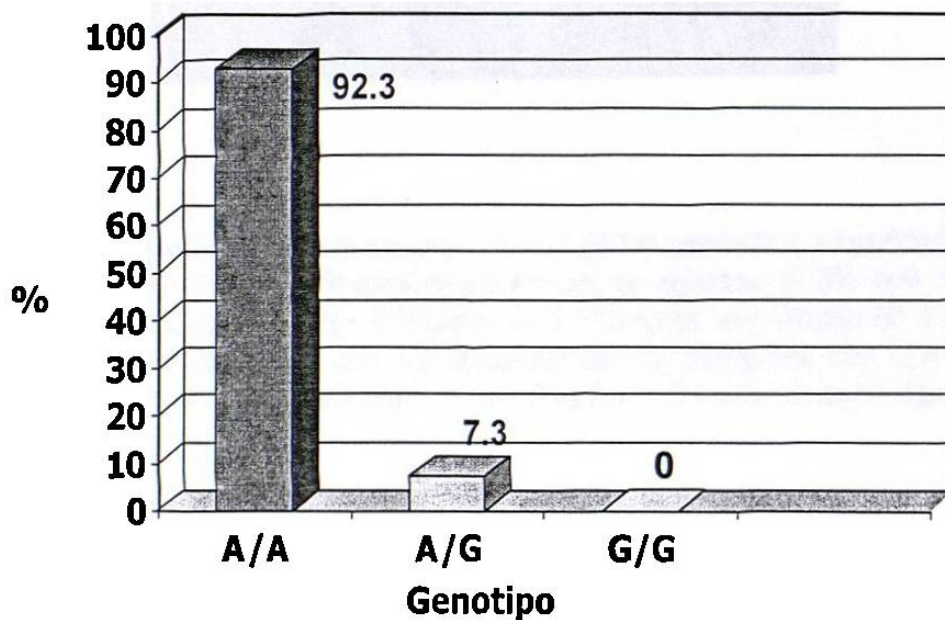


Fig. 9. Frecuencia del polimorfismo A61G en los pacientes con LLA

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).

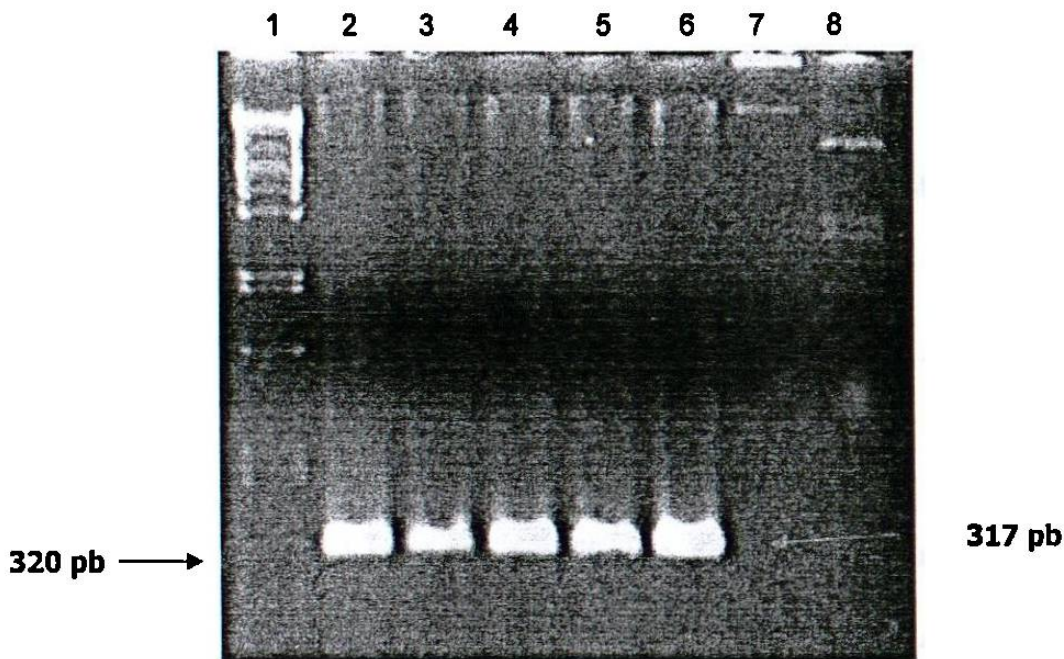


Figura 10. Digestiones con la enzima *Ban* II de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismo T307C. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en el Carril 1: Marcador pBS + *Msp* I; Carriles 2- 6: Producto amplificado de 317 pb digerido con *Ban* II. Las muestras que se observan son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

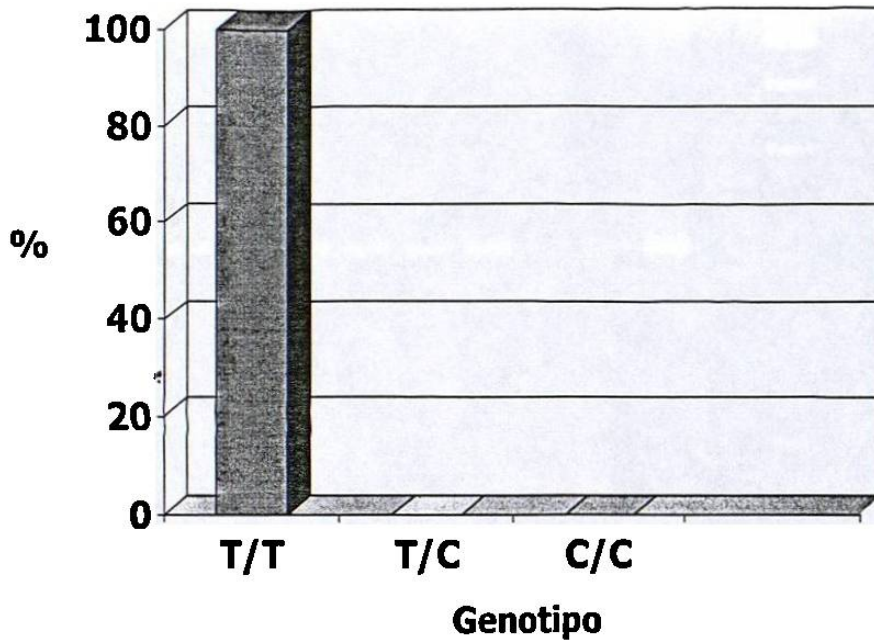


Fig. 11. Frecuencia del polimorfismo T307C en los pacientes con LLA

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)

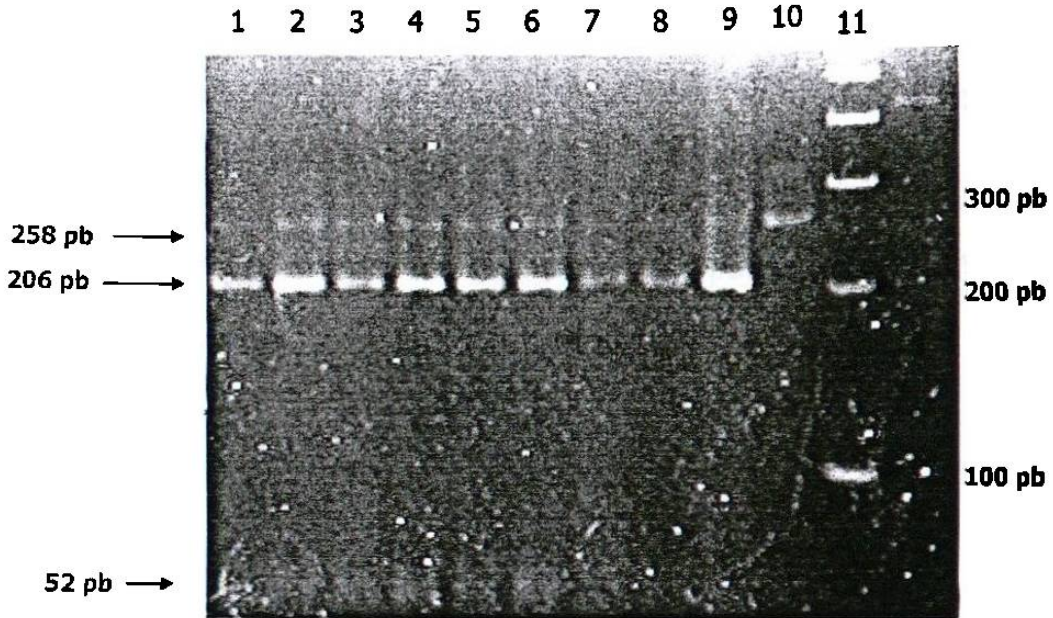


Figura 12. Digestiones con la enzima *Eco 571* de los productos amplificados de 258 pb del polimorfismo G1199A. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 10: Producto amplificado de 258 pb digerido con *Eco 571*. Carril 11: Marcador escalera de DNA de 100 pb. Las muestras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

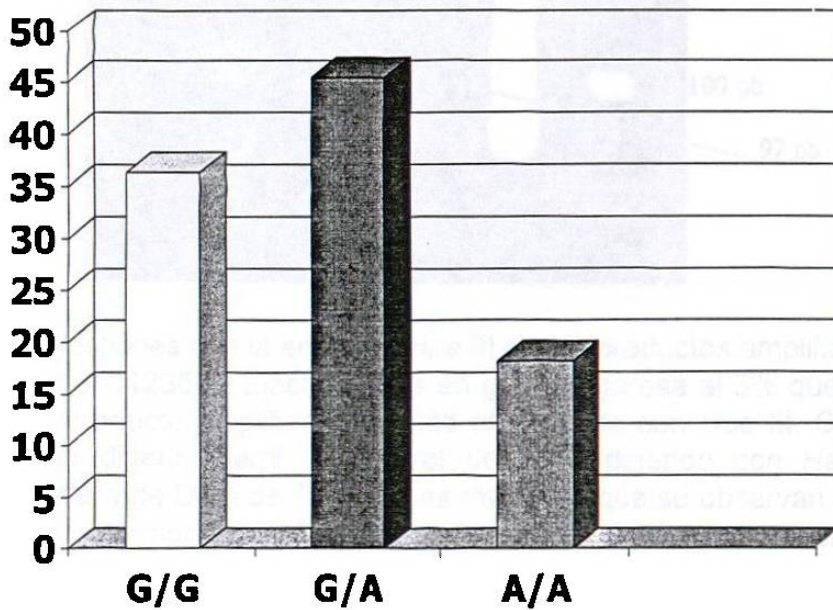


Fig. 13. Frecuencia del polimorfismo G1199A en los pacientes con LLA

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)

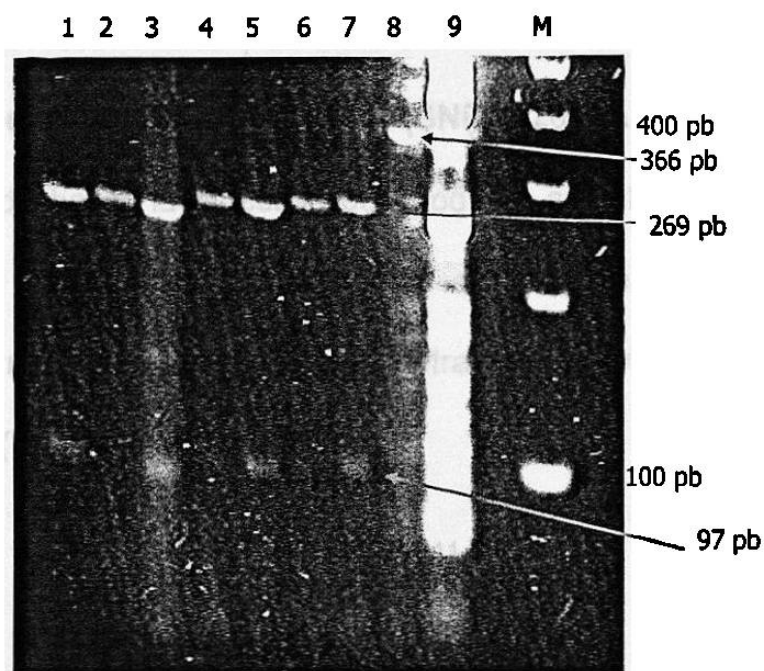


Figura 14. Digestiones con la enzima *Hae* III de los productos amplificados de 366 pb del polimorfismo C1236T. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 7: Producto amplificado de 366 pb digerido con *Hae* III. Carril 8: producto amplificado sin digerir. Carril 9: Control 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.

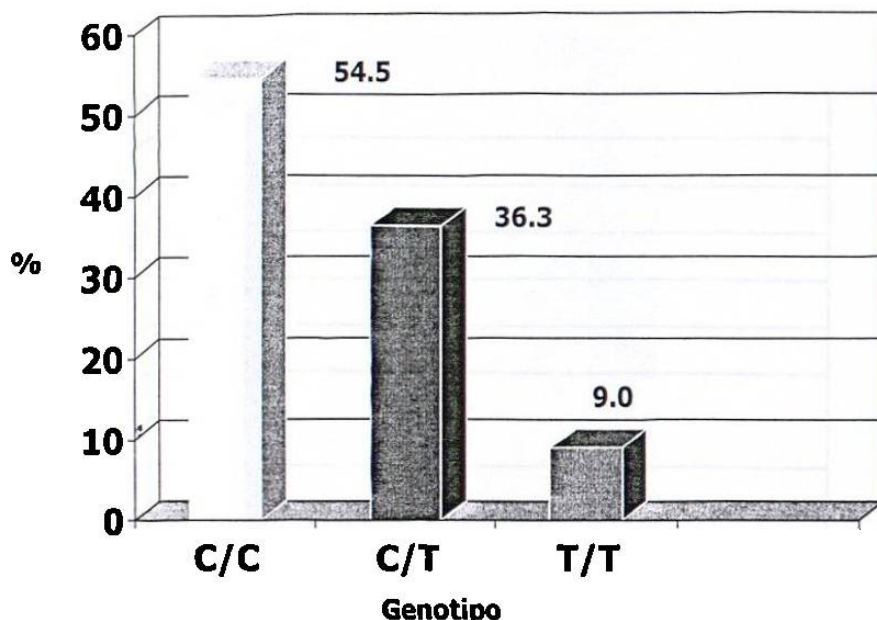


Fig. 15. Frecuencia del polimorfismo C1236T en los pacientes con LLA

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).

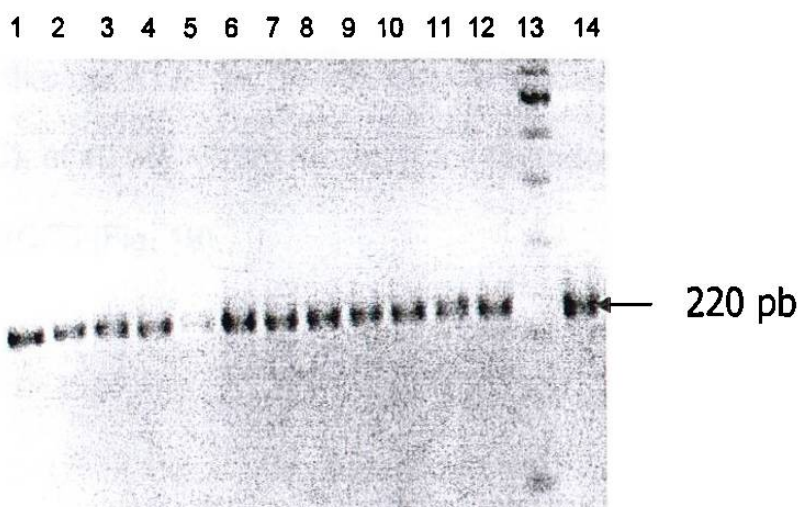


Figura 16. Digestiones con la enzima *Bsr* I de los productos amplificados de 220 pb del polimorfismo G2677A. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 12: Producto amplificado de 220 pb digerido con *Bsr* I. Carril 14: producto amplificado sin digerir. Carril 13: Marcador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

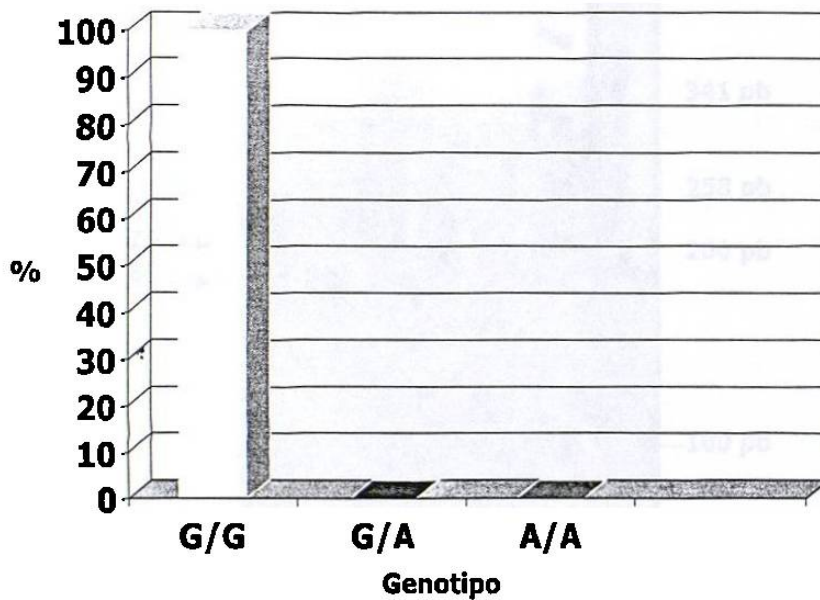


Fig. 17. Frecuencia del polimorfismo G2677A en los pacientes con LLA

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).

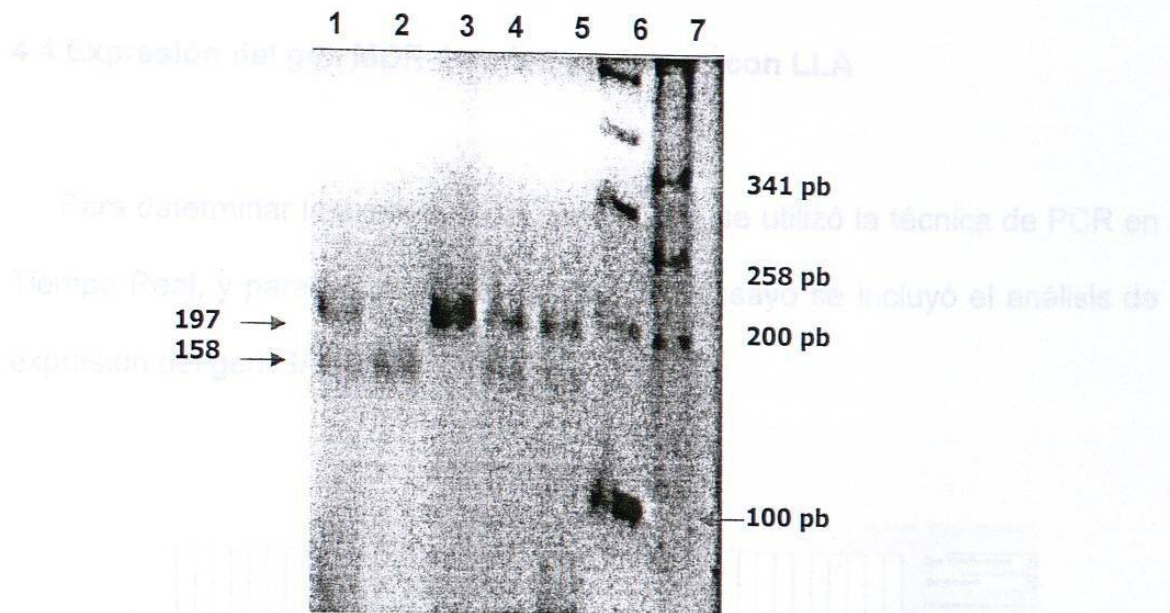


Figura 18. Digestiones con la enzima *Sau* 3AI de los productos amplificados de 197 pb del polimorfismo C3435T. Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestra en los Carriles 1- 5: Producto amplificado de 197 pb digerido con *Sau* 3AI. Carril 6: Marcador escalera de DNA de 100 pb. Carril 7: Control 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.

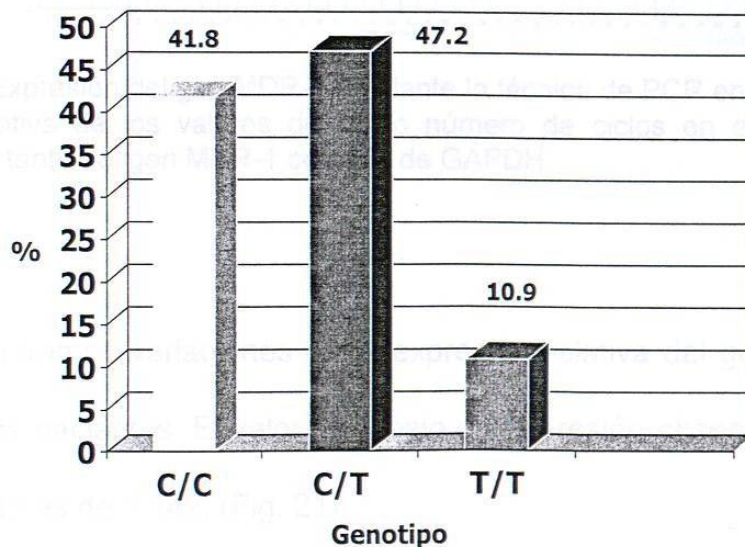


Fig. 19. Frecuencia del polimorfismo C3435T en los pacientes con LLA

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).

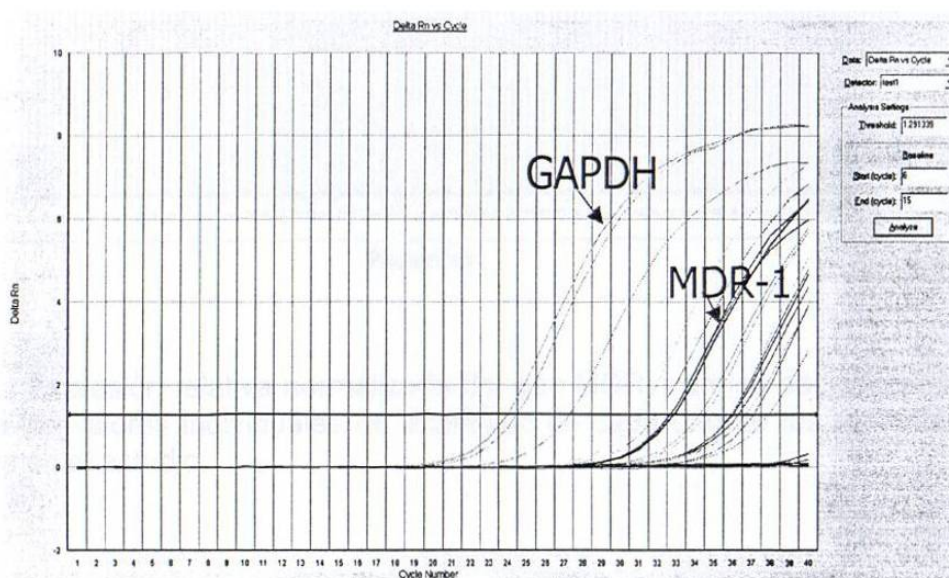


Fig. 20. Expresión del gen MDR-1 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real. Figura representativa de los valores de CT o número de ciclos en el que se detecta la expresión tanto del gen MDR-1 como el de GAPDH.

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).

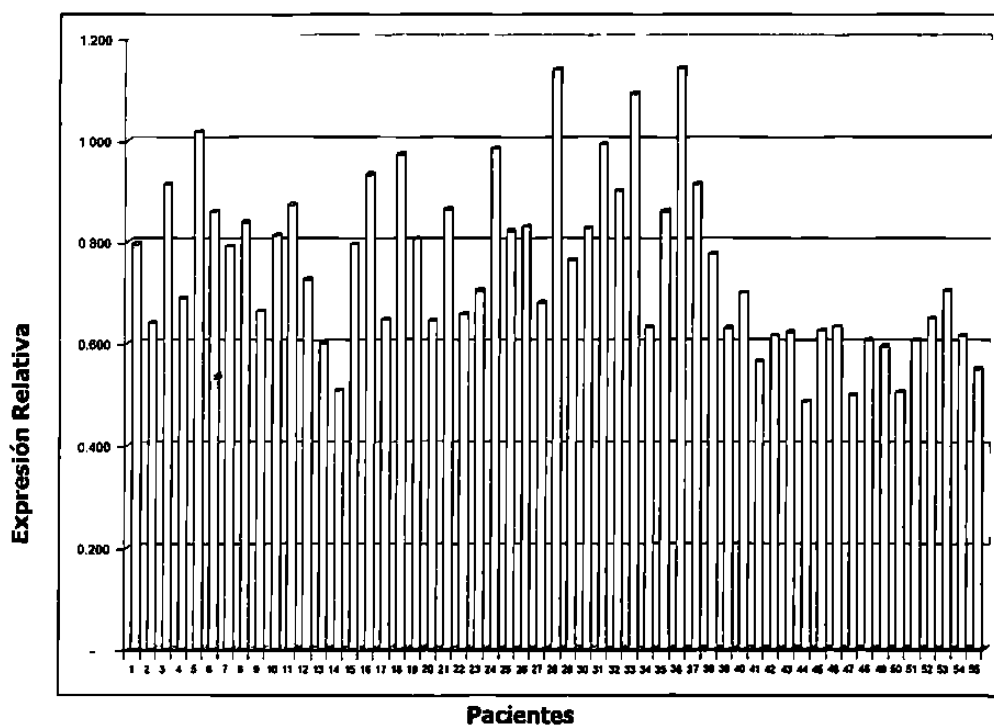


Fig. 21. Expresión relativa normalizada del gen MDR-1 en los pacientes con LLA. Se muestra los valores individuales de expresión de cada uno de los pacientes con LLA incluidos en el estudio.

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).

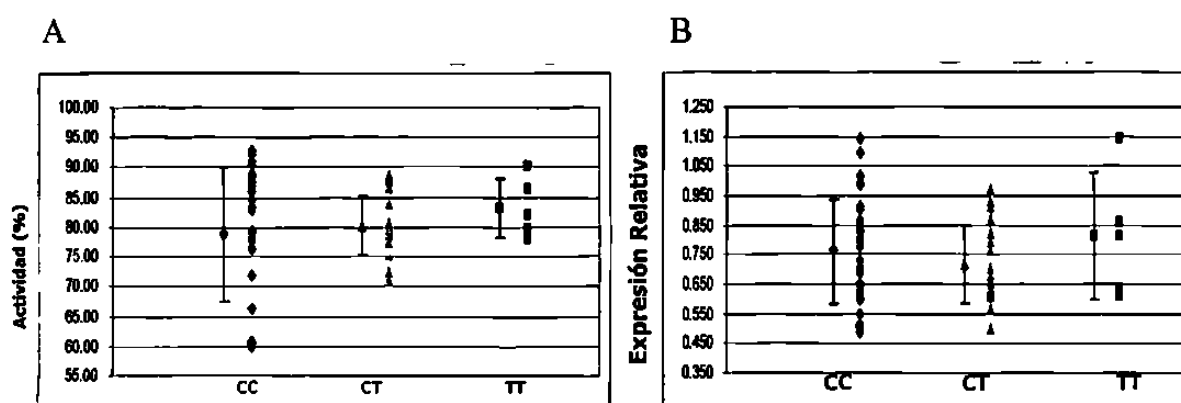


Fig.22. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C1236T y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 1236. (B), Resultados 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).

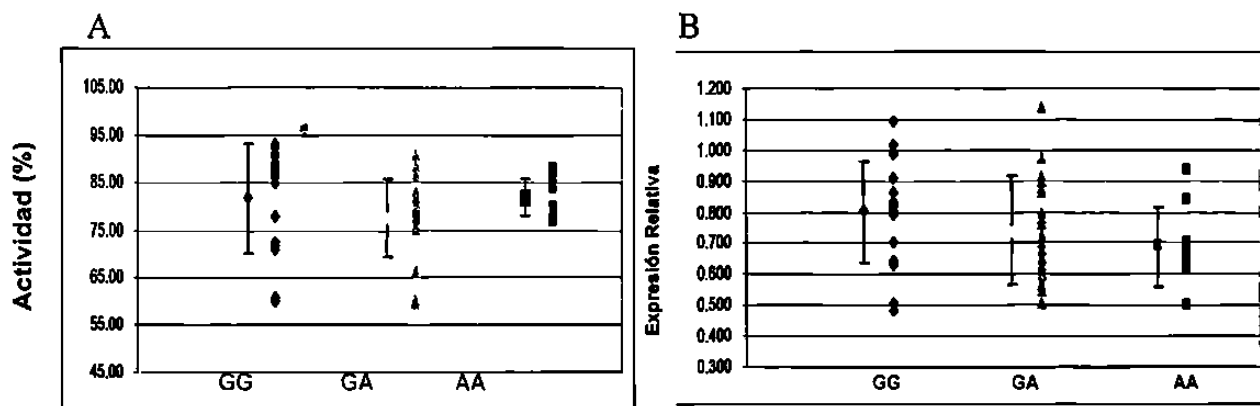


Fig.23. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo G1199A y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 1199. (B), Resultados 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.

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).

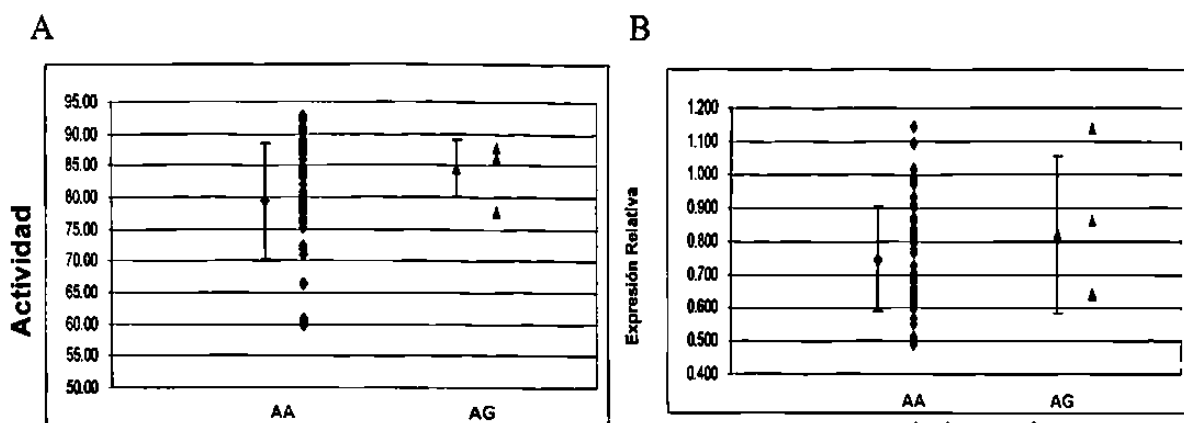


Fig.24. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo A61G y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 61. (B), Resultados 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).

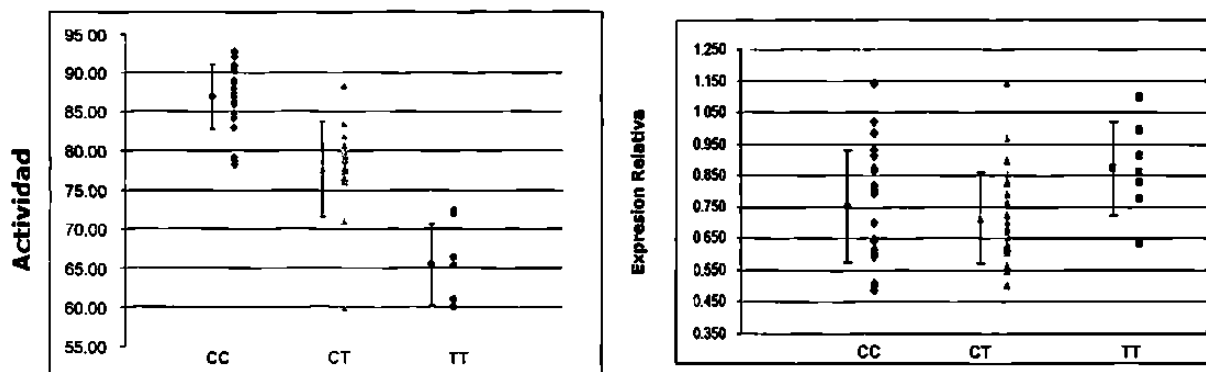


Fig.25. Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C3435T y la expresión del RNAm del gen MDR-1. (A), Resultados individuales (medias y desviación estándar) de la actividad de la Gp-P de las células mononucleares de los pacientes LLA con diferentes genotipos MDR-1 en la posición 3435, $P = 0.001$. (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 supervivencia 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.

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

Nosotros encontramos que los pacientes C/C 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).

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.
- 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 mas 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. Schinkel, 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 - 4411.

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 LLA₁ allele 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 α -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 Młynarski, Ewa Balcerczak, Magda Mistygacz, Joanna Trelńska, 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 leucemia. *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. Johne 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, Johne 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 allelic 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.



DONATIVO

