

ESTUDIO DE LA MULTIRESISTENCIA A DROGAS MEDIADA POR EL GEN MDR-1 EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA

PREMIO "BERNARDO GUZMAN BLANCO"

CORRENTI, M.*; HERRERA, O.*; CAVAZZA, M.E.*; SALMA, N.*; GUEDEZ, N.*; ARCIA ROMERO, F.***; SUÁREZ, R.*

RESUMEN: Se evaluaron 80 tumores de pacientes antes de recibir el tratamiento con quimioterapia y después del tratamiento se lograron analizar 60 tumores del grupo de pacientes pertenecientes al protocolo.

En los tumores analizados antes del tratamiento se observó que el 58% presentaron una sobreexpresión del gen MDR-1 mientras que el 43% de los tumores fueron negativos para este marcador. Al analizar la expresión del gen MDR-1 después de tres ciclos de quimioterapia se observó un incremento en el número de tumores positivos para MDR-1 (73%) con respecto a los pacientes que inicialmente fueron negativos para MDR-1 (27%), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02622$).

Aunque la quimioterapia combinada ha sido de gran impacto en la sobrevida de las pacientes con malignidades linfoproliferativas, la mayoría de los cánceres inicialmente son resistentes a la quimioterapia ó son sensibles pero adquieren resistencia durante el tratamiento tales como: los linfomas y los cánceres de mama.

La contribución relativa de la resistencia intrínseca que presenta el tumor antes de enfrentarse a la quimioterapia (58%) y la resistencia adquirida ($73\%-58\%=15\%$) que se observó posteriormente. También es importante destacar que se pudo evaluar la expresión de la P-gp por inmunohistoquímica en estas muestra, en donde se pudo corroborar la alta sensibilidad de las técnicas de biología molecular, ya que se presentaron muestras positivas por biología molecular y negativas por inmunocitoquímicas (10 muestras/60 muestras después del tratamiento). Los resultados inmunohistoquímicos demostraron un fuerte marcaje de células P-gp+ en la mayoría de las células tumorales significativamente relacionada con tumores que progresaron.

Se evaluó la expresión de oncogen myb en biopsias provenientes de pacientes con cáncer de mama obtenidas antes de iniciar el tratamiento y después de haberse concluido el mismo. En las muestras analizadas se observó un porcentaje de pacientes myb positivos del 55% y myb negativo un 45% antes del tratamiento y después del tratamiento se determinó: myb+: 57% y myb-: 43%. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$).

En el análisis de la expresión del oncogen c-myc en los tumores analizados antes del tratamiento (51% c-myc positivos y 49% c-myc negativos) y después del tratamiento (49% c-myc positivos y 51% c-myc negativos), se determinó que no existe una diferencia entre ambos grupos estudiados ($p>0,05$). Hoy en día es ampliamente conocido que los oncogenes celulares son genes importantes involucrados en el desarrollo de cáncer humano. Los miembros de la familia de los genes myc comprenden: c-myc, N-myc y L-myc codifican para proteínas nucleares que aparentemente tienen propiedades biológicas similares, cuya función es regular la replicación del ADN y la

transcripción de ARN. El resultado final de estas acciones a menudo es la potenciación de la proliferación celular o inhibición de la diferenciación terminal. El hecho que no haya variación significativa de los casos positivos antes y después del tratamiento indicaría que este oncogen no

* Instituto de Oncología y Hematología MSAS-UCV.

** Instituto de Biomedicina MSAS-UCV.

*** Cátedra de Clínica Quirúrgica A. Hospital Clínico Universitario - UCV.

está directamente ligado a los cambios que puede inducir la terapia sino a la evolución biológica propia de este tipo de tumores.

En 41 pacientes estudiados para el gen MDR-1 se pudo evaluar la respuesta al tratamiento. Se observó que el 14,63% de los pacientes MDR-1 positivo y el 9,7% MDR-1 negativo tuvieron una respuesta al tratamiento entre 0-2% ($p=0,392$). El 17,07% de los pacientes MDR-1 positivo y el 17,07% MDR-1 negativo presentaron una respuesta entre el 26-49% ($p=0,8500$); el 19,51% de los pacientes MDR-1 positivo y el 12,19% de los pacientes MDR-1 negativo, respondieron entre un 50%-79% ($p=0,176$). Ningún paciente MDR-1 positivo alcanzó una respuesta entre 80-100% con respecto a 9,76% MDR-1 negativo ($p=0,0035$).

En la evaluación del promedio del tamaño del tumor en los pacientes del estudio antes y después del tratamiento con relación a la expresión del gen MDR-1; se observó que el tamaño del tumor con marcador MDR-1 positivo fue de 10,9 cm en comparación a los tumores MDR-1 negativo que presentaron una media de 8,1 cm ($p=0,245$). Al analizar estos parámetros después del tratamiento, se observó una disminución del tamaño de los tumores MDR-1 positivo y MDR-1 negativo (6,9 cm y 4,7 cm, respectivamente); sin embargo, las diferencias entre ambos grupos analizados no fueron estadísticamente significativas ($p=0,110$).

En 11 de los pacientes estudiados después del tratamiento, se observó que el 82% (9/11) de los pacientes MDR-1 positivo, aumentaron, no modificaron o presentaron una reducción del tamaño del tumor < 10%, mientras que solamente el 18% (2/11) de los pacientes MDR-1 negativo presentaron un comportamiento similar, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p<0,00001$).

Estos resultados indicarían que la mayoría de las pacientes bajo los esquemas terapéuticos empleados en el presente protocolo, donde se incluyen drogas relacionadas y no relacionadas con el fenotipo MDR-1, logran disminuir el tamaño promedio del tumor; sin embargo, existe un grupo pequeño de pacientes cuyos tumores sobrepresen el gen MDR-1 y no sufren prácticamente ninguna reducción, probablemente porque estos tumores presentan un grupo considerable de células MDR-1 positivo que impiden la acción de la quimioterapia.

Al analizar la expresión del gen MDR-1 en relación con la evolución clínica de los pacientes se observó que 8 de los pacientes viven sin enfermedad y 18 pacientes MDR-1 positivo murieron con enfermedad ($p=0,00226$). En el grupo de pacientes que fueron MDR-1 negativo, 9 pacientes viven sin enfermedad y solamente uno murió con enfermedad ($p<0,05$). En el grupo de los pacientes muertos con la enfermedad se observó diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes positivos para MDR-1 (18/19) y negativos para el marcador biológico (1/19) ($p<0,0001$).

En el estudio de la expresión del gen MDR-1 y su relación con la sobrevida de los pacientes con cáncer de mama, se observó que las pacientes con tumores MDR-1 positivos presentan una probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (SLE) significativamente menor a la del grupo de las pacientes con tumores MDR-1 negativos. ($P=0,0363$). El análisis del riesgo relativo indicó que las pacientes MDR-1 positivas tienen un riesgo de recaída de 2,06 veces mayor que las pacientes MDR-1 negativas.

La sobrevida global (SG) de las pacientes MDR-1 negativo es significativamente mayor con respecto a las pacientes con el marcador positivo ($p=0,0109$). Las pacientes MDR-1 positivas tiene un riesgo relativo de morir de 4,3 veces con respecto a las pacientes con el marcador negativo.

En el análisis de la frecuencia de los marcadores MDR-1, P53 y erbB-2 en 68 tumores de mama, se observó que existen pacientes que presentan un solo marcador: 10,29% de pacientes P53 positivos, 8,82% MDR-1 positivos y 7,35% erbB-2 positivos; en el grupo de pacientes con dos marcadores se observó lo siguiente: P53/MDR-1 positivos (20,58%), P53/erbB-2 positivos (5,88%), erbB-2/MDR-1 positivos (4,41%); el 20,58% de los pacientes presentaron los tres marcadores positivos mientras que el 22,06% de las pacientes presentaron tumores negativos para estos marcadores.

14. Expresión del oncogen erbB-2 y su asociación con la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama

Las pacientes con tumores erbB-2 positivos presentan una probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (SLE) similar a la del grupo de las pacientes con tumores erbB-2 negativos ($p=0,830$). La sobrevida global (SG) de las pacientes con tumores erbB-2 negativos y positivos no presentan diferencias significativas ($p=0,350$). El riesgo relativo de morir en las pacientes con tumor positivo para erbB-2 es 1,5 veces mayor que las pacientes con tumor erbB-2 negativo.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Hirotaka y col. (1997), donde al evaluar la expresión de erbB-2 por inmunohistoquímica y por EIA no se observó asociación entre la sobrevida libre de enfermedad y erbB-2 como factor pronóstico. En cáncer de mama ha habido dificultad en determinar el valor pronóstico de erbB-2 ya que probablemente se debieran establecer criterios unificados en cuanto a factor como extensión de metástasis a nódulos linfáticos y grado histológico, es decir pacientes con estadio clínico y patológico idéntico.

Las pacientes con tumores P53 mutada analizada por inmunocitoquímica, presentan una probabilidad de sobrevida libre de enfermedad similar a la del grupo de las pacientes con tumores P53 negativos ($p=0,531$). El riesgo relativo de recaída es de 1,2 veces mayor en las pacientes con tumores P53 positiva que las pacientes con tumores P53 negativo. La sobrevida global de las pacientes P53 negativa es significativamente mayor con respecto a las pacientes con el marcador positivo ($p=0,0029$). Las pacientes con tumores P53 positivo tienen un riesgo relativo de morir de 3,1 veces con respecto a las pacientes con el marcador negativo.

Las pacientes con tumores que presentan la P53 mutada se benefician menos de los regímenes de quimioterapia en comparación con las pacientes que presentan la P53 normal. Los resultados indican que existe una asociación con un pobre pronóstico en las pacientes con tumores que presentan P53 mutada, probablemente debido a la aumentada capacidad proliferativa de las células tumorales con P53 mutada o a la gran resistencia que presentan estas células tumorales cuyo crecimiento debería ser inhibido por una variedad de agentes quimioterapéuticos.

En la población analizada en el presente estudio, se observó que de 26 pacientes con tumores con P53 mutada, 18 de las pacientes recayeron y murieron ($p=0,01148$). En el grupo de 15 pacientes con tumores P53-, se determinó que 4 de las pacientes murieron con la enfermedad y 11 pacientes viven sin enfermedad durante los meses de seguimiento.

Las pacientes con tumores P53/MDR-1 positivos presentan una sobrevida global significativamente menor con respecto a las pacientes con ambos marcadores biológicos negativos ($p=0,0117$). Las pacientes con tumores P53/MDR-1 positivo presentan un riesgo relativo de morir de 5,3 veces con respecto a las pacientes con P53/MDR-1 negativos. Recientemente se ha reportado que la expresión de la P-glicoproteína producto del gen MDR-1 y la P53 mutada están asociadas con un pobre pronóstico en cáncer de mama. La expresión de la P-gp con reactividad cruzada para varias drogas anticancerosas y las evidencias que la P53 mutada se encuentran involucradas en resistencia a drogas sugieren que ambos marcadores tienen una relevancia en el seguimiento de pacientes con cáncer de mama. En este estudio las pacientes con coexpresión de P53 y P-gp presentaron un factor pronóstico pobre y una sobrevida global mas corta.

INTRODUCCION

El fracaso de la quimioterapia para erradicar todas las células cancerosas puede ser debido a una variedad de causas. Una de las posibilidades es la capacidad que tienen algunas células a desarrollar resistencia a drogas. Recientemente, se han hecho algunos progresos para entender el mecanismo de resistencia a drogas usando células en cultivo. El término Multiresistencia a Drogas (MDR), es usado para describir el amplio espectro de resistencia cruzada que exhiben estas células a ciertos productos citotóxicos naturales (Cordon-Cardo y col., 1989).

La resistencia a drogas puede ser clasificada como intrínseca o adquirida. Esta división puede ser interpretada como arbitraria; sin embargo, permite hacer una simple distinción operacional para determinar si el organismo o la célula es resistente al inicio del tratamiento, o si inicialmente es sensible a drogas y llega a ser

resistente únicamente después que se encuentra bajo tratamiento (Hayes y Wolf, 1990).

La resistencia intrínseca (natural o "de novo") describe la situación donde un organismo o célula, posee una característica diferencial que permite a todos los miembros normales de esa especie tolerar una droga en particular o un medio químico ambiental. En este caso, la característica responsable de la resistencia es inherente, o integral, es decir, es una propiedad de las especies, que ha surgido a través del proceso de evolución. Este fenómeno puede ser debido a la presencia o ausencia de una característica bioquímica, por ejemplo; la estructura de la membrana celular, la existencia de proteínas de transporte, la ausencia de vías metabólicas, la estructura de los sitios blancos, la expresión de proteínas específicas al estrés o la alta capacidad de reparación (Hayes y Wolf, 1990).

El término resistencia adquirida es usado para describir el caso donde una línea celular re-

sistente emerge de una población que previamente ha sido sensible, y que presenta resistencia no sólo al agente selectivo, sino también a otras muchas drogas naturales con diferentes estructuras y mecanismos de acción. Algunas

de las drogas relacionadas a la multiresistencia (Tabla I), inhiben la formación de microtúbulos, mientras que otros dañan al ADN o inhiben la síntesis de ARN (Hayes y Wolf, 1990).

Tabla I
Drogas naturales utilizadas para tratar el cáncer

DROGA	BLANCO INTRACELULAR	FAMILIA MDR
Doxorubicina	ADN	Sí
	Topoisomerasa II	
Adriamicina	ADN	Sí
	Topoisomerasa II	
Ciclofosfamida	ADN	No
5-Fluorouracilo	ADN	No
Mitroxantone	ADN	Sí
	Topoisomerasa II	
Daunomicina	ADN	Sí
	Topoisomerasa II	
Camptotesina	Topoisomerasa II	No
Vinblastina	Tubulina	Sí
Vincristina	Tubulina	Sí
Taxol	Tubulina	Sí
Actinomicina D	ARN de Transcripción	Sí
Bleomicina	Daño al ADN	No

Tomado de Pastan y col., 1991.

OBJETIVOS

1. Determinar la expresión del gen de multiresistencia a drogas al nivel de ARNm, en biopsias de pacientes y líneas celulares, para detectar la sobreexpresión del mismo y su implicación en fenómenos de resistencia a la quimioterapia
2. Determinar si la quimioresistencia está asociada a la expresión de oncogenes como c-myc, c-myb y H-ras
3. Determinar la expresión del gen MDR-1 al nivel de la glicoproteína de membrana gp170, utilizando el anticuerpo monoclonal C219 en inmunocitoquímica.
4. Análisis de p53 mutada y el oncogen c-erbB-2 por inmunocitoquímica y su asociación con la expresión del gen MDR-1 en las biopsias de cáncer de mama

PACIENTES Y METODOS

Pacientes

Se estudiaron 80 pacientes con cáncer de mama, de sexo femenino, antes de iniciar la quimioterapia y en 60 pacientes del estudio inicial fue posible obtener una muestra de tumor después de haber finalizado el tratamiento. La historia clínica incluyó los siguientes aspectos: edad, estadio clínico y anatomopatológico, tratamiento y evolución clínica.

A continuación se observan las características:

- Edad: el promedio de las pacientes fue de $49,4 \pm 11,50$ años, comprendida en un rango entre 19 y 70 años.
- Tamaño del tumor: La evaluación del tamaño del tumor fue realizada de acuerdo al siguiente criterio: T1= menores o iguales a 2 cm, T2= tumores entre 2 y 5 cm, T3= entre 5 cm y 10 cm, y T4 = tumores > 10 cm. En las pacientes estudiadas se observa que el 1,65% presentan tumores < 2 cm; 1,66% de las pacientes presentan tumores de 2-5 cm; 15 de las pacientes tienen tumores de 6-10 cm y 48% de las pacientes presentan tumores mayores de 10 cm
- Estadio clínico y anatomopatológico: se empleó la clasificación T.N.M.. Las pacientes presentan los siguiente estadios: Estadio II (3,33%), Estadio IIIA(15%), Estadio IIIB (61,66%) y Estadio IV (16,66%). Ninguna de las pacientes incluidas en el estudio presentaron Estadio I.
- Evolución clínica: el período de seguimiento clínico de las pacientes se realizó entre 1 y 52 meses.
- Tratamiento: CMF-L+GM-CSF (C=ciclofosfamida, 400 mg/m², intravenoso, día 1, 2, 3; M=mitroxantone: 7 mg/m², i.v. día 1, 2; F= 5-fluorouracilo, 400 mg/m², i.v. día 1, 2, 3; Leucovorine: 20 mg/m², i.v. antes del 5-FU; GM-CSF: leu-

comax, 7 mg/kg de peso/día, de 10 a 14 días).

FAC: 5-fluorouracilo, A=adriamicina y ciclofosfamida. Los nombres en negrilla señalan las drogas relacionadas con el fenotipo MDR-1.

El esquema terapéutico usualmente implica tres ciclos de quimioterapia y posteriormente cirugía.

Material biológico

Líneas Celulares utilizadas para analizar la expresión del gen MDR-1.

SKOV3 (sensible a vimblastina). Niveles de expresión basales < 0,1 MDR-1-ARNm. Usualmente no presenta el fenómeno de amplificación.

SKVLB1 (resistente a vimblastina). Niveles de expresión basales < 300 MDR-1-ARNm (evaluado por densitometría a partir de 10 ug de ARN total).

SKOV3 y SKVLB1 son líneas celulares provenientes de pacientes con Sarcoma de Ovario Humano, gentilmente cedidas por la Dra. Marie. F. Poupon. Instituto Curie, Francia. Las líneas celulares fueron utilizadas como controles positivos y negativos de la expresión del gen MDR-1 y como patrones en el análisis de la sobreexpresión.

Biopsias de Pacientes.

Biopsias de Tumor de Mama.

Biopsias de Mama Normal.

Drogas empleadas en los cultivos celulares

Doxorubicina 10 mg (Tecnofarma).

Disuelta en agua destilada en condiciones de esterilidad antes de su uso.

Antibióticos utilizados en los cultivos celulares

Fungizona 250 mcg/ml (Quality Biological, Inc.).

Penicilina 10.000 u/ml (Gibco).

Streptomicina 10.000 mcm/ml (Gibco).

Anticuerpos.

Anticuerpo monoclonal P-glycoCHEK C219 (Centocor).

Anti-DIG-alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim Biochemica).

Anti-mouse IgG biotinilado (Vectastain).

Anticuerpo monoclonal anti c-erbB2/neu (DAKO)

Anticuerpo monoclonal anti-P53 (DAKO)

Sondas

β -tubulin Pr-1, 40 mer (Oncogene).

Human MDR-1 Pr-1, 40mer (Oncogene).

C-myc, Pr-1, 40 mer (cDNA probe; reconoce una región de 0,4 kb del exon 2 del oncogen c-myc; Onogene)

c-myb, Pr-1, 40 mer (cDNA probe; reconoce una región de traducción hacia el extremo 5').

H-ras 12 Muta probe set (detecta 7 mutaciones sobre los codones 12,13)

Primers

Primers MDR:

4A: Oligo antisens de 20 bass 2596. Exón 21.

CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG.

4B: Oligo antisens de 20 bass 2733. Exón 22.

GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA.

Primers β_2 -Microglobulina:

5A: Oligo sens 1543.

ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA.

5B: Oligo sens 2253.

ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG.

Los primers usados en este estudio fueron sintetizados por GEN SET (Francia).

Primers H-ras

H-ras point Primer TM set (amplifica los codones 12,13 de H-ras)

Patrón de peso molecular.

100 Base Pair Ladder (Gibco BRL).

ϕ X-174.

Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares SKOV3 (sensible) y SKVLB1 (resistente). La línea celular SKVLB1 es inicialmente resistente a 1 μ g/ml de vimblastina y posteriormente resistente a doxorubicina a una concentración máxima de 0,4 μ g/ml.

Las células SKOV3 y SKVLB1, son crecidas en medio mínimo esencial DMEM, suplementado con 10% de suero fetal y antibióticos al 1%, cultivadas a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire. Paralelamente, la variante multiresistente es obtenida por exposiciones continuas de la línea parental (SKVLB1) a concentraciones crecientes de doxorubicina desde 0,01 a 0,4 μ g/ml. El medio es reemplazado dos veces a la semana manteniendo el siguiente esquema: 4 días en presencia de la concentración de la droga correspondiente, y 5 días de descanso sin droga. Se repite el esquema aumentando la concentración.

Las sublíneas resistentes obtenidas, son mantenidas en presencia de la doxorubicina a la concentración de droga correspondiente (0,01-0,4 μ g/ml).

Cultivo de células sobre laminillas

Una vez formada la monocapa, las células tanto sensibles como resistentes, son desprendidas con tripsina 0,25% - EDTA 0,1%, resuspendidas en medio DMEM no suplementado y centrifugadas a 1,400 r.p.m. El sedimento es resuspendido nuevamente en medio suplementado y 50 μ l de la suspensión son colocadas sobre láminas cubre objeto estériles 22x22, previamente colocadas en cápsulas de petri de

35 mm, que contienen 1 ml de medio suplementado.

Se deja que las células formen una monocapa sobre laminillas durante 1 día. Posteriormente se lavan los cubre objetos con PBS y se fijan con metanol durante 5 min.

Se almacenan a -20°C hasta su uso en inmunoperoxidasa.

Extracción de ARN total de líneas celulares y biopsias de tumores de mama para la evaluación de la expresión del gen MDR-1

Procesamiento de las Líneas Celulares:

La lisis celular se realiza añadiendo el RNazol B directamente en el falcon. Para un falcon de 75 ml se agregan 1,6 ml de RNazol B; se reparten 800 μl en cada eppendorf y se añaden 80 μl de cloroformo; luego de centrifugar por 15 min. a 12.000 g el ARN es recolectado de la fracción acuosa, a la que se le agrega un volumen igual de isopropanol y se procede a dejar precipitando toda la noche. Posteriormente, se centrifuga por 15 min. a 12.000 g a 4°C . El sedimento obtenido es lavado con etanol 75%, se deja secar y se procede a disolver el ARN en 50 μl de agua libre de RNAsas. Se almacena a -70°C hasta su uso.

Procesamiento de la Muestra Tumoral:

Las muestras de biopsias de tumores de mama fueron obtenidas de los pacientes en estadio III, antes de aplicar el tratamiento, incluidos en el protocolo quimioterapéutico CMF-L+GM-CSF del Instituto de Oncología y Hematología y el Hospital Clínico Universitario de Caracas.

Las muestras de aproximadamente 100 mg son transportadas y almacenadas en nitrógeno líquido.

Para obtener la muestra ARN se procede de la siguiente manera:

Preparar el pulverizador de tumores de la forma adecuada, lo cual consiste en colocar en

la batea hielo seco y una mezcla propanol: metanol 1:1, flamear tanto el recipiente de muestra como el émbolo del aparato y enfriarlos antes del proceso. En el plato se coloca la muestra e inmediatamente se añade el nitrógeno líquido. El émbolo debe ser disparado varias veces hasta pulverizar el tumor, mientras el recipiente de muestra es rotado continuamente.

El tumor pulverizado es recolectado con una espátula previamente esterilizada y tratada con agua + DEPC. Colocada en un tubo eppendorf de 1,5 ml al que se le agregan 800 μl de buffer lisis (RNazol B) + 80 μl de cloroformo. Se continúa la extracción de manera similar al procesamiento de las líneas celulares.

Cálculo de la concentración de ARN

Se realizan diluciones de la muestra 1/500 o 1/1000 y se procede a medir su densidad óptica a 260 y 280 nm.

Para determinar la concentración en $\mu\text{g/ml}$, se realiza la siguiente equivalencia:

1 DO a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/ml}$.

Todas las concentraciones de ARN de las líneas celulares y de los tumores fueron determinadas utilizando el lector de ADN/ARN Gene Quant (Pharmacia).

Marcaje de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos son marcados con una cola de DIG-dUTP (Boehringer Mannheim Biochemica).

Para 20 μl de reacción de marcaje, se requiere:

Tailing Buffer, 4 μl .

Solución de CoCl_2 , 4 μl .

Oligonucleótido sin marcar, 5 μl .

DIG-dUTP, 1 μl .

dATP, 1 μl .

Transferasa Terminal, 1 μl .

En caso de ser necesario completar el volumen final a 20 µl con agua destilada deionizada.

Incubar a 37° C por 30 min.

Mantenerse a -20° C, hasta su uso.

Control de Marcaje:

Colocar 2 µl del oligo marcado en una membrana Zeta-Probe (BIO-RAD), previamente humedecida en agua.

Dejar secar, realizar cross-linking en el GS Gene-Linker™ (BIO-RAD): Programa C1.

Realizar detección colorimétrica o por quimioluminiscencia.

RNA SLOT BLOT

Desnaturalización y Fijación alcalina del RNA.

Se tomaron 5 µg de RNA realizándose diluciones seriadas de la misma 1/2, 1/4 y 1/8, para ser fijadas sobre membranas de Zeta Probe (BIO-RAD).

Inmediatamente antes de usar, disolver el RNA en 500 µl de NaOH 10mM, EDTA 1 mM, en frío. Ensamblar el aparato de microfiltración BIO-DOT® SF Microfiltration Apparatus (BIO-RAD) con la membrana previamente humedecida.

Agregar el RNA y aplicar vacío suave aproximadamente 40 mbar. Lavar los pozos con 500 µl de la solución desnaturalizante. Dejar secar la membrana y aplicar cross-linking en el GS Gene-Linker™, Programa C1, 30mJoule.

Se procede a realizar la hibridación con la sonda MDR-1, c-myc, c-myb y β tubulina, previamente marcada. Se realiza detección colorimétrica o por quimioluminiscencia, en ambos casos las membranas y/o placas de rayos X fueron analizadas por densitometría (Densitómetro 690, Biorad).

Hibridación molecular

Hibridar las membranas en 20 ml de solución de pre-hibridación a 65° C por 1 h. Posteriormente, incubar toda la noche a 65° C en solución de hibridación con la sonda marcada.

Al día siguiente lavar las membranas con:

2X SSC + SDS 0,1%, 10 min. a temperatura ambiente.

1X SSC+ SDS 0,1%, 10 min. a 65° C.

13.6ª. Detección colorimétrica.

Lavar las membranas en Buffer 1, durante 1 min. Incubar en Buffer 2 por 30 min. Luego incubar con el conjugado diluido 1/5000 en Buffer 2, por 30 min. Lavar dos veces las membranas en Buffer 1 (5 min. cada lavado). Equilibrar las membranas en Buffer 3, por 2 min. Posteriormente, revelar con NBT, X-Fosfatasa y Buffer 3, en total oscuridad. Detener la reacción colocando las membranas en Buffer 4.

Detección por Quimioluminiscencia.

Se procedió de acuerdo al método del manual de Boehringer. Equilibrar las membranas en Buffer 1, durante 1 min., y bloquear los sitios inespecíficos con Buffer 2 de 30 min. a 1 h. Luego incubar con el conjugado, diluido 1/10.000 en Buffer 2, por 30 min. Lavar dos veces las membranas en Buffer 1 (15 min. cada lavado). Equilibrar las membranas en Buffer 3, por 2 min. Posteriormente, revela con Lumi-Phos 530, colocando las membranas en láminas de acetato, una vez humedecidas con el Lumi-Phos, revelar en placas de rayos X. Si se quiere reintentar la hibridación con otra sonda, no dejar secar la membrana, manteniéndola en Buffer 4, hasta el momento de despegar la sonda.

Obtención de ADNc

Las muestras de ARN total provenientes de las líneas celulares sensibles y resistentes, así como de las biopsias de tumores de mama y de

mama normal (2 µg de ARN), se proceden a desnaturalizar, (agregar agua libre de ARNasa para completar el volumen a 8 µl), a 65° C por 10 min. Luego de enfriar en hielo agregar lo siguiente: (Estuche de Pharmacia Biotech).

Bulk First-Strand Reaction Mix 5 µl.

Primer pdN6 1 µl.

DTT 1 µl.

Incubar 1 h a 37° C y almacenar a -20° C, hasta su uso.

TR-RCP para la detección de la expresión del gen MDR-1

El ADNc obtenido de las líneas celulares sensibles y resistentes, así como de las biopsias de mama, son analizadas por RT-PCR en presencia del transcripto MDR-1 y β₂ microglobulina, este último como control interno de la reacción.

El PCR es realizado en un termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.), para esto 10 µl de cDNA son incubados con:

Buffer 10X libre de MgCl₂, 5 µl.

MgCl₂, 6 µl.

dNTPs (A,G,C,T), 0,2 µl de cada uno.

Primers (4A, 4B, 5^A, 5B) 50 pmol, 1 µl de cada uno.

Taq Polimerasa, 0,5 µl.

Agua destilada deionizada, 73,7 µl.

Aceite Mineral, 50 µl.

Programa:

5' a 94° C.

50'' a 94° C.

50'' a 57° C. 40 ciclos

20'' a 72° C.

10' a 72° C.

La muestra es analizada en un gel de poliacrilamida para ácidos nucleicos al 8%. El gel es teñido en bromuro de etidio. El tamaño del producto amplificado es visualizado con un transiluminador de luz U.V. y es fotografiado para su registro permanente.

Los pesos moleculares de las bandas coloreadas, fueron determinados por comparación con marcadores de peso molecular conocido (100 Pair Ladder).

Tamaño del Amplificado:

4A/4B 160 pares de bases (MDR-1).

5^A/5B 120 pares de bases (β₂ microglobulina).

Análisis de la expresión del gen MDR-1

Líneas Celulares.

Para determinar si existe expresión del transcripto MDR-1, a medida que se incrementa la concentración de droga, se procede a correr la misma cantidad de muestra (8 µg) y además se realizaron diluciones de las mismas 1/10, 1/30 y 1/50.

Muestra Tumoral.

Para determinar si existe expresión del transcripto MDR-1, en muestras de biopsias de tumor, se procede a correr la misma cantidad de muestra (8µg).

Inmunoperoxidasa.

La inmunotinción se realizó empleando el sistema de inmunoperoxidasa con Avidina-Biotina (Hsu y col., 1981).

Células en Cultivo.

Para detectar la glicoproteína-P en células individuales, se utilizó el anticuerpo monoclonal C219, el cual detecta un epítipo altamente conservado en la región citoplasmática de la glicoproteína.

Las láminas cubreobjetos con la monocapa de células, previamente fijadas con metanol por 5 min., fueron hidratadas por 5 min. en PBS y

los sitios inespecíficos bloqueados con BSA al 3% por 20 min. El anticuerpo C219 es usado a una dilución 1/500 en PBS al 3% de BSA e incubado por 1 h. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón biotinilado) durante 45 min a una dilución 1/200. Se lavó con PBS 5 min. y se incubó por 30 min. con el complejo AB (Avidina-Biotina). El revelado de las láminas utiliza la mezcla cromógeno-sustrato (9,5 ml de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,3; 500 µl de AEC en solución y 50 µl de peróxido al 3%). Se contrasta con methyl green por 15 min., diferenciando con agua de chorro. Montar con gelatina glicerizada.

Biopsias de Tumores.

En el caso de las muestras tumorales, se procedió a realizar en el criostato, los cortes congelados del tejido, de aproximadamente 3,5 µm, los cuales se colocan sobre láminas previamente desgrasadas y embebidas en PLL. Luego se dejan secar los cortes toda la noche. Posteriormente, se fijan 5 min. en acetona fresca y se sigue el mismo esquema empleado para las líneas celulares, utilizando el anticuerpo monoclonal C219, con la única diferencia que se contrasta con hematoxilina de meyers 5 min. y se diferencia con agua de chorro 5 min.

Los anticuerpos para c-erbB2 y P53 mutada fueron utilizados en cortes de biopsias frescas

Análisis estadístico

Las asociaciones de los datos provenientes de cada uno de los marcadores biológicos fueron evaluadas por t de Student, Chi-cuadrado y test de Fisher (programa Instat 4.0).

Las curvas de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida global (SG) se realizaron utilizando el método de Kaplan-Meier y el análisis univariado de realizó mediante la prueba de log-rank (Programa GraphPad Prism).

RESULTADOS OBTENIDOS

ANÁLISIS. APLICABILIDAD E IMPORTANCIA DE LOS MISMOS

3.1.- Reconocimiento de la glicoproteína-p por el anticuerpo monoclonal C219 mediante inmunoperoxidasa

Se examinó la expresión de la glicoproteína-P en líneas celulares sensibles (SKOV3) y resistentes (SKVLB1).

Empleando el anticuerpo monoclonal C219 fue posible observar un marcaje en la periferia de las células SKVLB1 y una tinción en el citoplasma (Foto 1a), mientras que no se observó marcaje en las células sensibles (Foto 1b) ni en el control negativo donde se ha sustituido el anticuerpo monoclonal C219 por PBS (Foto 1c).

**RECONOCIMIENTO DE LA GLICOPROTEINA -P POR EL ANTICUERPO
MONOCLONAL C219 MEDIANTE INMUNOPEROXIDASA EN LINEAS CELULARES**

Foto 1a

Línea Celular Resistente (SKVLB1)

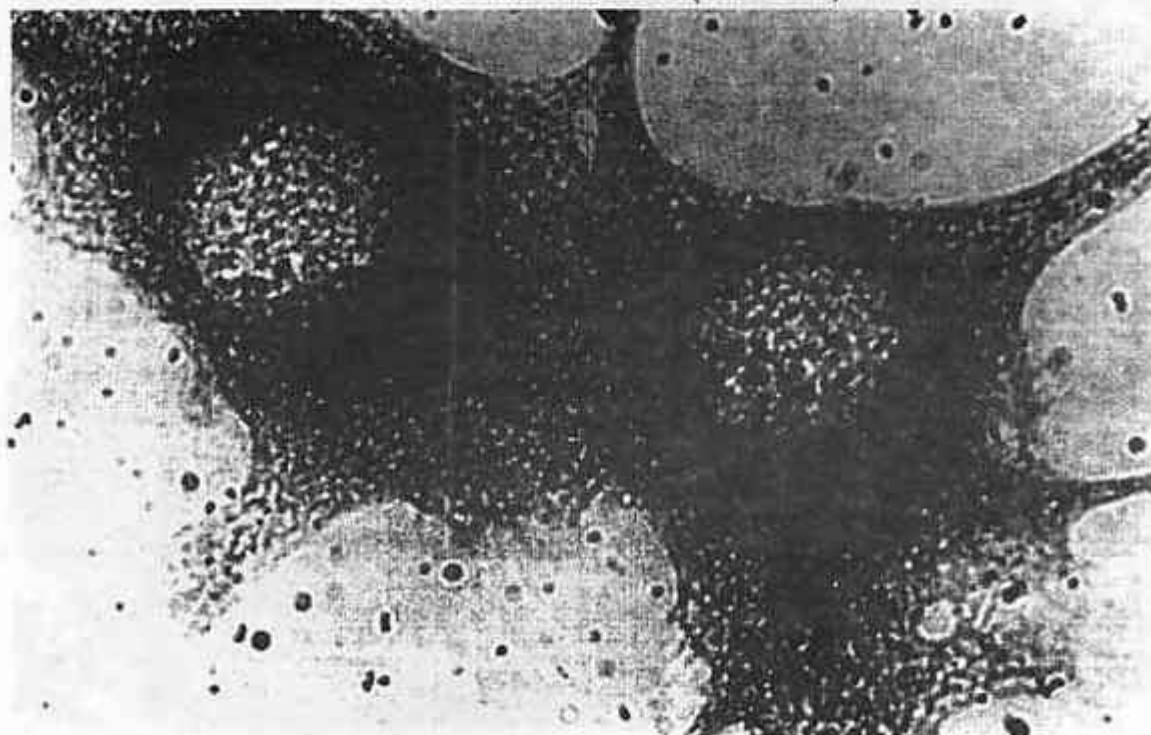


Foto 1b

Línea Celular Sensible (SKOV3)

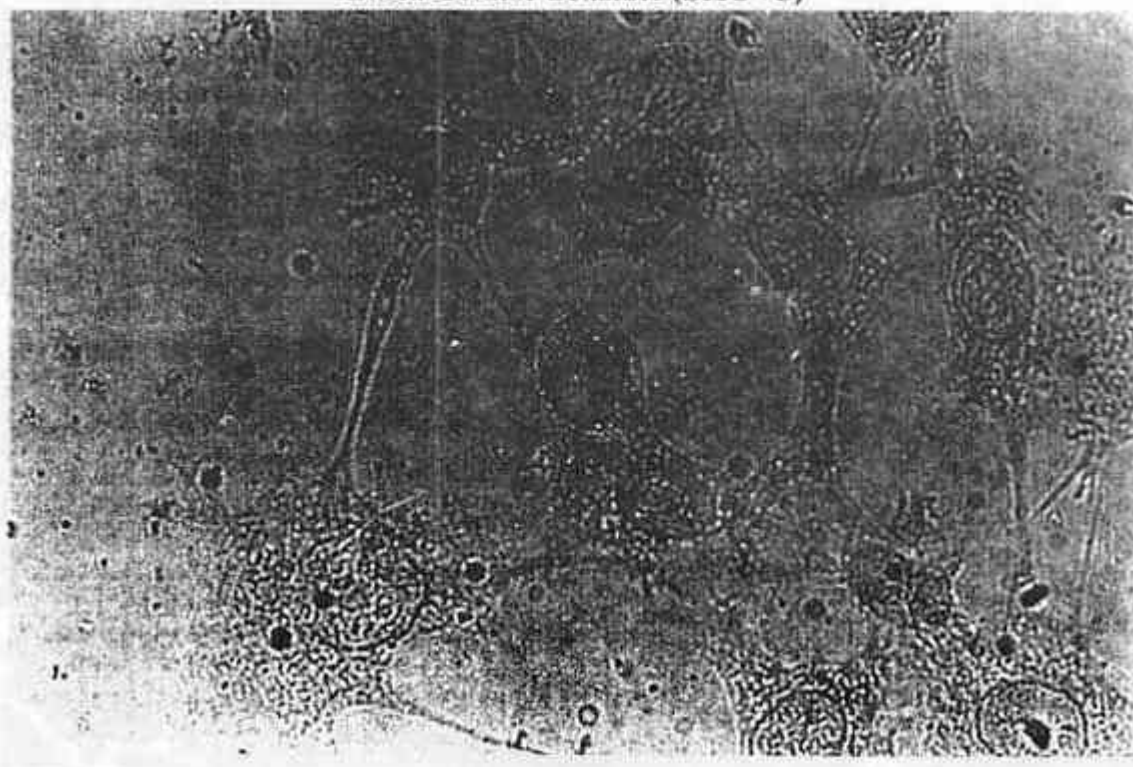


Foto 1c

Control Negativo: El Anticuerpo Monoclonal C219 ha sido Sustituido por PBS.



En la determinación de la expresión de la glicoproteína-P en células resistentes se observa un aumento gradual del marcaje de la glicoproteína, que corresponde a las concentraciones de la doxorubicina de 0,01-0,4 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Se encontró, que a medida que las células se hacen multiresistentes, la intensidad de la tinción también aumenta, concentrándose en la región perinuclear de la célula y en las prolongaciones que emiten las células adheridas al soporte sólido.

3.2.- Reconocimiento de la glicoproteína-P empleando el Anticuerpo Monoclonal C219 en Biopsias de Tumores

En el análisis de los cortes congelados de tejido de tumor de mama, empleando el anti

cuerpo el monoclonal C219, fue posible observar tejido tumoral cuyas células se encuentran dispuestas formando pequeños ductos, revestidos por células neoplásicas. Mediante un aumento de 400 X se puede evidenciar un material pardo rojizo de aspecto granular llenando las luces ductales. En algunas áreas se puede ver el mismo tipo de marcaje alrededor de las células tumorales (Foto 2a).

En la Foto 2b podemos observar múltiples células tumorales dispuestas formando un patrón sólido, rodeadas por abundante líquido de edema. Se identifica un marcaje muy evidente de color pardo rojizo granular que está llenando el citoplasma de las células neoplásicas y delimitando el contorno de la membrana plasmática.

Foto 2a
Biopsia de Tumor de Mama del Paciente 1 (P1)

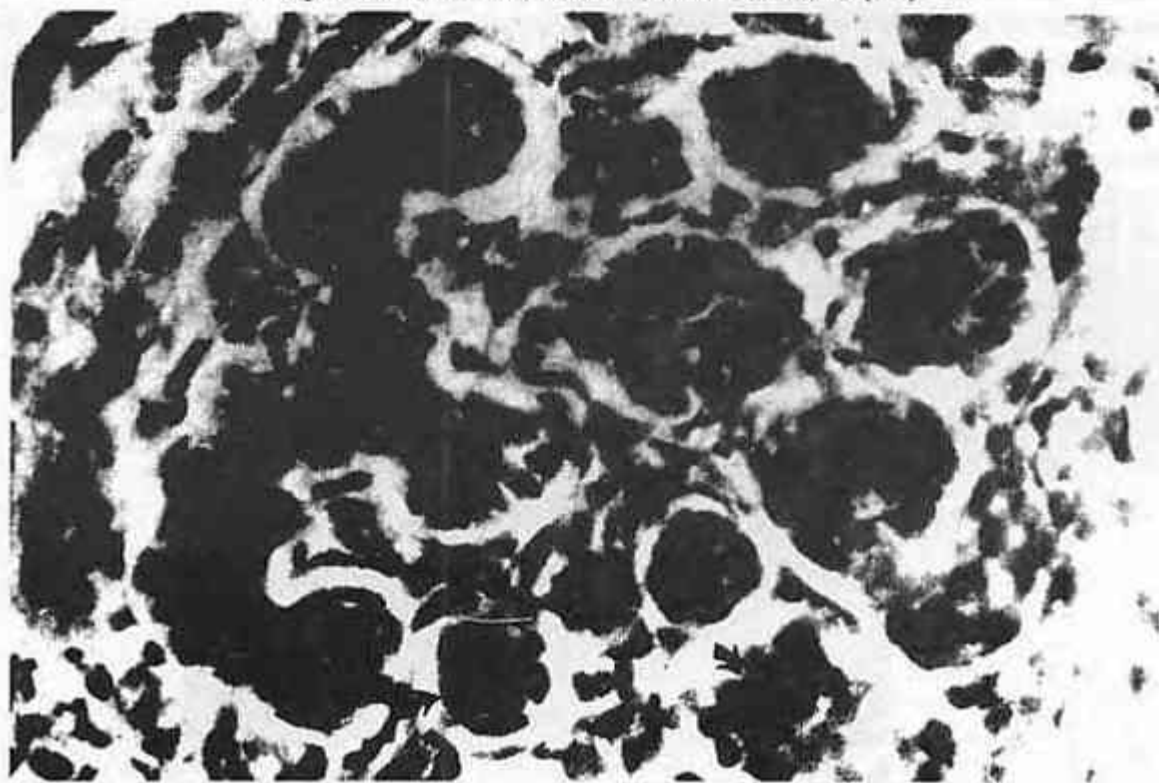


Foto 2b
Biopsia de Tumor de Mama del Paciente 2 (P2)

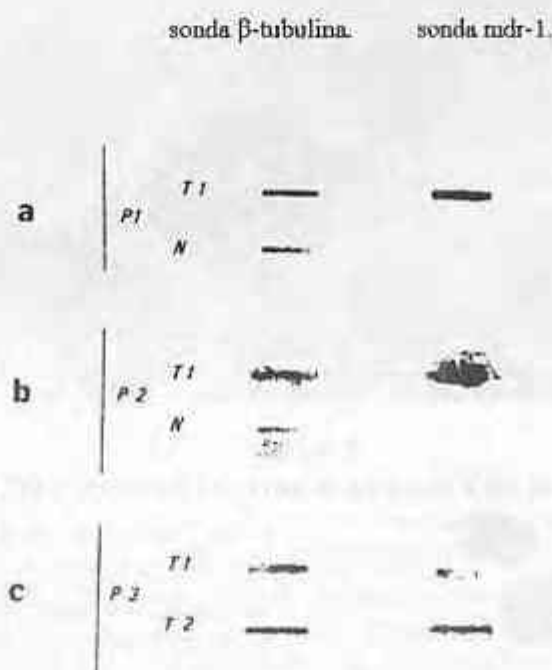


3.3.- Determinación de la expresión del gen MDR-1 por hibridación molecular, en biopsias de tumor de mama mediante sondas anti sentido

La expresión del gen MDR-1 fue evaluada en biopsias de tumor de mama y en algunos casos en tejido normal de mama del mismo paciente. En las muestras obtenidas de los pa-

cientes P1 y P2 pudo observarse la expresión del gen MDR-1 en los tejidos tumorales a diferencia de las muestras provenientes de la mama contralateral sin evidencias de tumor (Foto 3). En ambos tipos de tejidos se determinó la expresión del gen β -tubulina indicando que el material del ARNtotal no presentó degradación.

Foto 3



T 1: Muestra Tumoral antes de aplicar el tratamiento

T 2: Muestra Tumoral después de aplicar el tratamiento

N: Muestra de Mama Normal

La hibridación molecular muestra que en dos biopsias de tumor antes (T1) y después de la quimioterapia (T2), donde se denota una señal más intensa en la muestra aislada del T2 con respecto a la detectada en la primera biopsia, lo que indicaría una mayor expresión del gen MDR-1, luego que el paciente 3 (P3) fue sometido a tres ciclos de quimioterapia.

3.4. Análisis de la expresión del gen MDR-1 por tr-rcp en células sensibles y resistentes

La utilización de la transcripción reversa permitió obtener ADNc a partir del ARNtotal previamente aislado mediante el método de Tiocianato de Guanidina (sección materiales y métodos), y en el cual se debe encontrar el ARNm correspondiente al gen MDR-1. Al realizar la reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores o iniciadores específicos para la

amplificación del ADNc correspondiente a los productos MDR-1 y β_2 microglobulina, se observó una amplificación específica del transcrito MDR-1 de 160 pb obtenido en las células resistentes SKVLB1; sin embargo no se observó

señal para el gen MDR-1 en el carril correspondiente a células sensibles, aunque si se visualizó la banda compatible con la amplificación del ADNc del transcrito del gen de β_2 microglobulina de 120 pb (Foto 4).

Foto 4



1. Marcador de PM (ladder 100Kb)
2. Control Negativo de la RCP
3. Células Sensibles (SKOV3)
4. Células Resistentes (SKVLB1)
5. ADN No Relacionado

3.5. Evaluación de la expresión del gen MDR-1 por tr-rcp en células sensibles y resistentes sometidas a diferentes concentraciones de doxorubicina

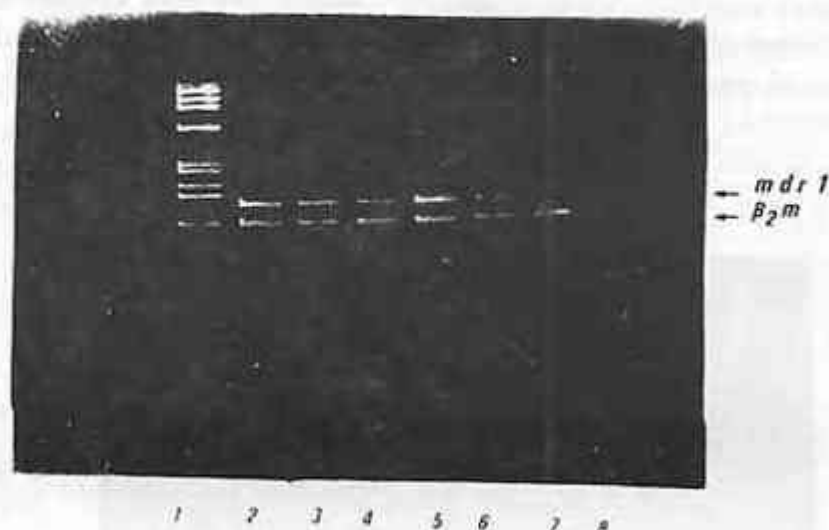
En la evaluación de la expresión del gen MDR-1 mediante TR-RCP a partir de transcritos purificados de células resistentes sometidas a concentraciones crecientes de doxorubicina (0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 0,4 $\mu\text{g/ml}$) se observó que existe

una expresión incrementada del gen MDR-1 cuando la línea celular se mantiene bajo presión selectiva.

En todas las muestras fue posible observar la banda correspondiente al control interno de β_2 microglobulina indicando que el proceso de transcripción reversa fue eficiente en cada uno de los experimentos.

En las células sensibles no se observó expresión detectable del gen MDR-1 pero sí del gen β_2 microglobulina (carril 7 Foto 5).

Foto 5

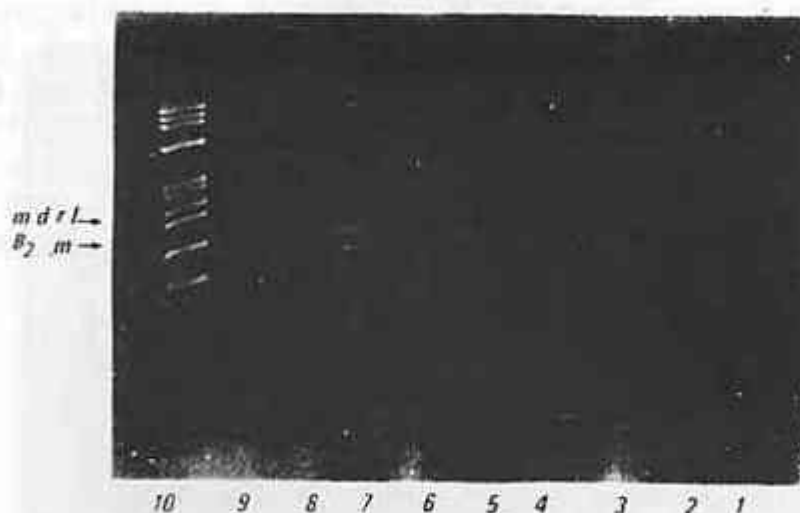


1. Marcador de PM (ladder 100Kb)
2. Células Resistentes (SKVLB1) sometidas a 0,4 µg/ml de Dox
3. Células Resistentes (SKVLB1) sometidas a 0,3 µg/ml de Dox
4. Células Resistentes (SKVLB1) sometidas a 0,2 µg/ml de Dox
5. Células Resistentes (SKVLB1) sometidas a 0,1 µg/ml de Dox
6. Células Resistentes (SKVLB1) sometidas a 0,01 µg/ml de Dox
7. Células Sensibles (SKOV3)
8. Control Negativo de la RCP

El resultado anterior fue corroborado realizando diluciones 1/10 y 1/50 de los productos de TR-RCP del RNA total de células sensibles y resistentes a doxorubicina. En la Foto 6 se observa que los productos de amplificación de células sensibles presentan únicamente la banda correspondiente a β₂ microglobulina hasta la dilución 1/10 (carril 2 y 3). La expresión del

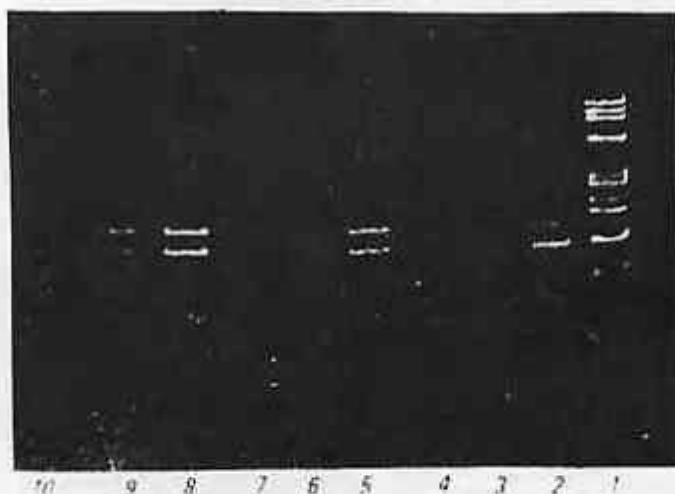
gen MDR-1 comenzó a detectarse en los productos de amplificación de las células resistentes en cultivo con 0,01 µg/ml de doxorubicina, observándose un aumento de la expresión del gen MDR-1 a partir de una concentración de 0,1 µg/ml hasta 0,4 µg/ml en las diluciones analizadas (Foto 6).

Foto 6a



- | | | |
|------------------------------------|------------------|------------------|
| 1. SKOV3 8 µg de ARN | 2. Dilución 1/10 | 3. Dilución 1/50 |
| 4. SKVLB1 0,01 de Dox. 8 µg de ARN | 5. Dilución 1/10 | 6. Dilución 1/50 |
| 7. SKVLB1 0,1 de Dox. 8 µg de ARN | 8. Dilución 1/10 | 9. Dilución 1/50 |
| 10. Marcador de PM (Ph 1X-174) | | |

Foto 6b



- | | | |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| 1. Marcador de PM (Ph 1X-174) | 3. Dilución 1/10 | 4. Dilución 1/50 |
| 2. SKVLB1 0,2 de Dox. 8 µg de ARN | 6. Dilución 1/10 | 7. Dilución 1/50 |
| 5. SKVLB1 0,3 de Dox. 8 µg de ARN | 9. Dilución 1/10 | 10. Dilución 1/50 |
| 8. SKVLB1 0,4 de Dox. 8 µg de ARN | | |

SKOV3: Células Sensibles - SKVLB1: Células Resistentes

3.6. Evaluación de la expresión del gen MDR-1 por tr-rnp en biopsias de tumores de mama

Se ha analizado la expresión del transcripto MDR-1 en muestras de pacientes, cuyo RNA-total ha sido extraído de la biopsia del tumor y tejido de la mama normal del mismo paciente, antes y después de ser sometidos a la quimio-

terapia. Al comparar con la expresión del transcripto, observada en líneas celulares resistentes y sensibles, los resultados indican que de cuatro (4) pacientes evaluados por RT-PCR, todos expresan el transcripto MDR-1 en la muestra tumoral (Foto 7), mientras que en la muestra normal parece presentar niveles basales o ninguna expresión del gen de multiresistencia.

Foto 7



1. Marcador de PM (ladder 100Kb)
2. Control Negativo de la RCP
3. P4/Biopsia 2
4. P5/Tejido Normal de Mama
5. P5/Biopsia 1
6. P6/Tejido Normal de Mama
7. P6/Biopsia 1
8. P7 Tejido Normal de Mama
9. P7/Biopsia 1
10. P7/Biopsia 2

B1: Biopsia antes de la Quimioterapia - B2: Biopsia después de la Quimioterapia

3.7. Evaluación de la expresión de los oncogenes c-myc y myb en tumores de mama

En las fotos N°. 8, 9, 10 se observan las señales después de haber realizado la hibridación

con las sondas de c-myc, myb y beta-tubulina como control interno del material de ARNt

Foto 8

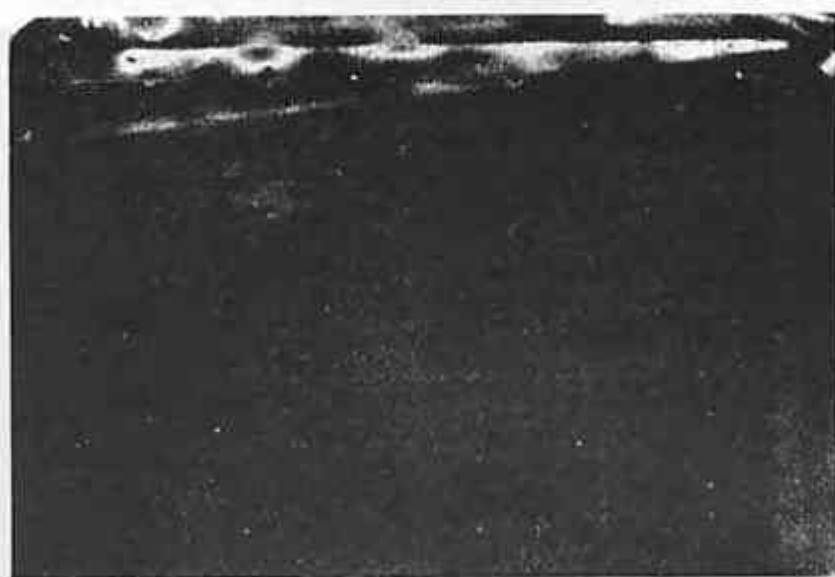


Foto 9

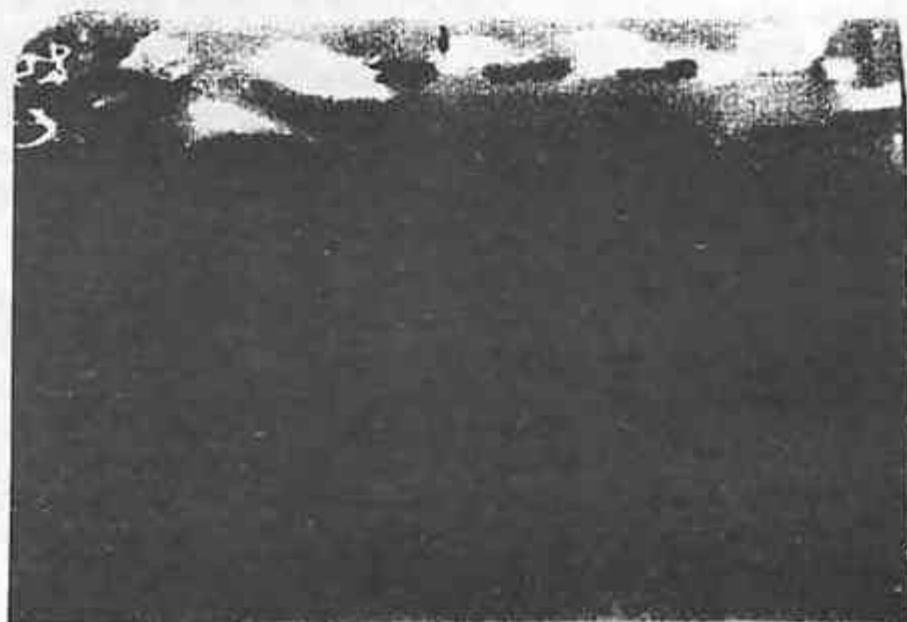


Foto 10



3.8. Evaluación del oncogen H-ras, codón 12

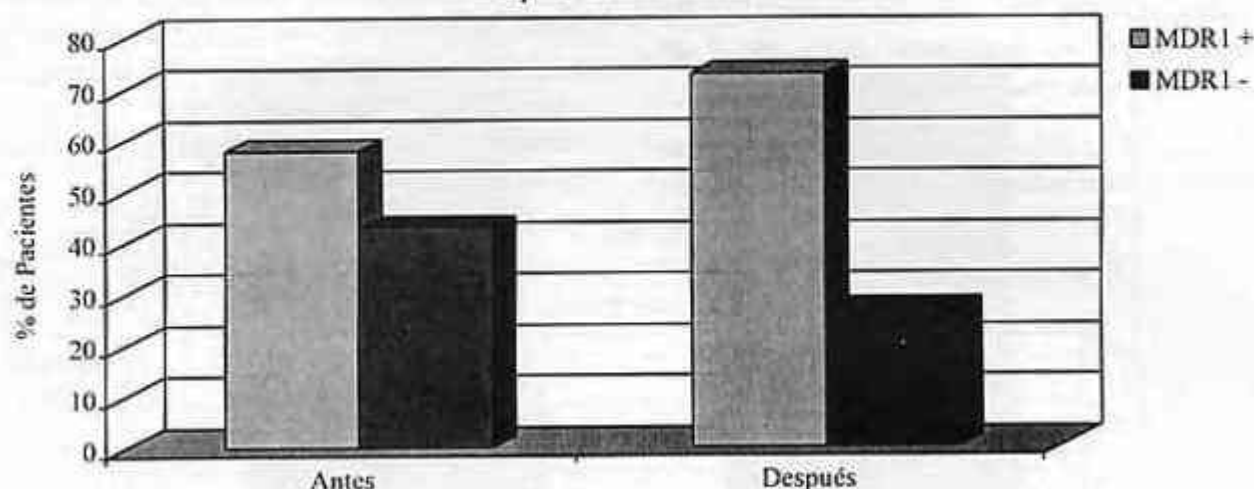
En ninguna de las evaluaciones realizadas para la determinación de las 7 mutaciones principales del oncogen H-ras, en el codón 12 se pudo evidenciar la presencia de alguna muestra de mama que tuviese alguna mutación de este codón. En estudios futuros habría que analizar por lo menos tres codones mas con las mutaciones más importantes en cada uno de ellos y relacionarlo con la expresión del gen MDR-1. En este estudio únicamente se planteó estudiar H-ras, codon 12 como inicio de la investigación de este oncogen en este tipo de malignidades.

3.9.- Evaluación de la expresión del gen MDR-1 en pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento

Se evaluaron 80 tumores de pacientes antes de recibir el tratamiento con quimioterapia y después del tratamiento se lograron analizar 60 tumores del grupo de pacientes pertenecientes al protocolo. En los tumores analizados antes del tratamiento se observó que el 58% presentó una sobreexpresión del gen MDR-1 mientras que el 43% de los tumores fue negativos para este marcador (Gráfico No 1).

Al analizar la expresión del gen MDR-1 después de tres ciclos de quimioterapia se observó un incremento en el número de tumores positivos para MDR-1 (73%) con respecto a los pacientes que inicialmente fueron negativos para MDR-1 (27%), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02622$). (Gráfico N°. 1).

Gráfico 1
Evaluación de la Expresión del Gen MDRI en Pacientes con Cáncer de Mama Antes y Después del Tratamiento



Aunque la quimioterapia combinada ha sido de gran impacto en la sobrevida de las pacientes con malignidades linfoproliferativas, la mayoría de los cánceres inicialmente son resistentes a la quimioterapia ó son sensibles pero adquieren resistencia durante el tratamiento tales como: los linfomas y los cánceres de mama.

Las células tumorales que desarrollan resistencia a través del mecanismo de MDR (multi-resistencia a drogas) simultáneamente desarrollan resistencia cruzada a varios productos naturales estructuralmente no relacionados. Aunque se ha reportado una tasa de respuesta significativa a la doxorubicina y taxanes en cáncer de mama también se ha visto que posteriormente se desarrolla resistencia y recaídas en enfermedad avanzada.

Los resultados son de gran interés ya que se ha podido determinar la expresión del gen MDR-1 en biopsias de tumor obtenidas antes del tratamiento (58% MDR-1 positivo) y después del mismo (73% MDR-1 positivo), empleando agentes citotóxicos que son sustrato de la P-gp. Esto ha permitido discernir entre la contribución relativa de la resistencia intrínseca

que presenta el tumor antes de enfrentarse a la quimioterapia (58%) y la resistencia adquirida ($73\%-58\%=15\%$) que se observó posteriormente. Además que el estudio se pudo realizar con biopsias de tumor frescos y con un protocolo de quimioterapia que incluyeron el Mitoxantrone y la Doxorubicina, ambos pertenecientes al fenotipo MDR-1 ya que son sustrato de la P-gp.

También es importante destacar que se pudo evaluar la expresión de la P-gp por inmunohistoquímica en estas muestra, en donde se pudo corroborar la alta sensibilidad de las técnicas de biología molecular, ya que se presentaron muestras positivas por biología molecular y negativas por inmunocitoquímicas (10 muestras/60 muestras después del tratamiento). Los resultados inmunohistoquímicos demostraron un fuerte marcaje de células P-gp+ en la mayoría de las células tumorales significativamente relacionada con tumores que progresaron. La importancia del estudio inmunohistoquímico es que se pueden analizar células individuales de tal forma que las células tumorales que expresan la P-gp pueden ser diferenciada de las células normales adyacentes, mientras que el

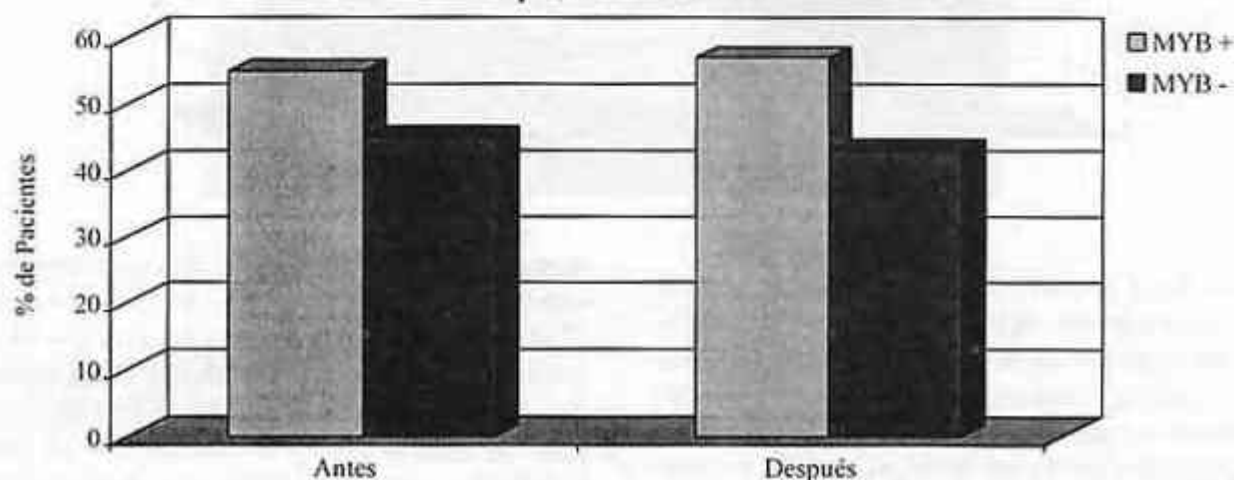
aislamiento del RNA a partir de tumores sólidos no tiene esa capacidad de discriminación.

3.10.- Evaluación de la expresión del oncogen myb en pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento

Se evaluó la expresión de oncogen myb en biopsias provenientes de pacientes con cáncer

de mama obtenidas antes de iniciar el tratamiento y después de haberse concluido el mismo. En el Gráfico N°. 2 se puede observar que el porcentaje de pacientes myb positivos (55%) y myb negativo (45%) antes del tratamiento y después del tratamiento (myb+: 57% y myb-: 43%) no fueron estadísticamente significativos ($p>0,05$)

Gráfico 2
Evaluación de la Expresión del Gen MYB en Pacientes con Cáncer de Mama Antes y Después del Tratamiento



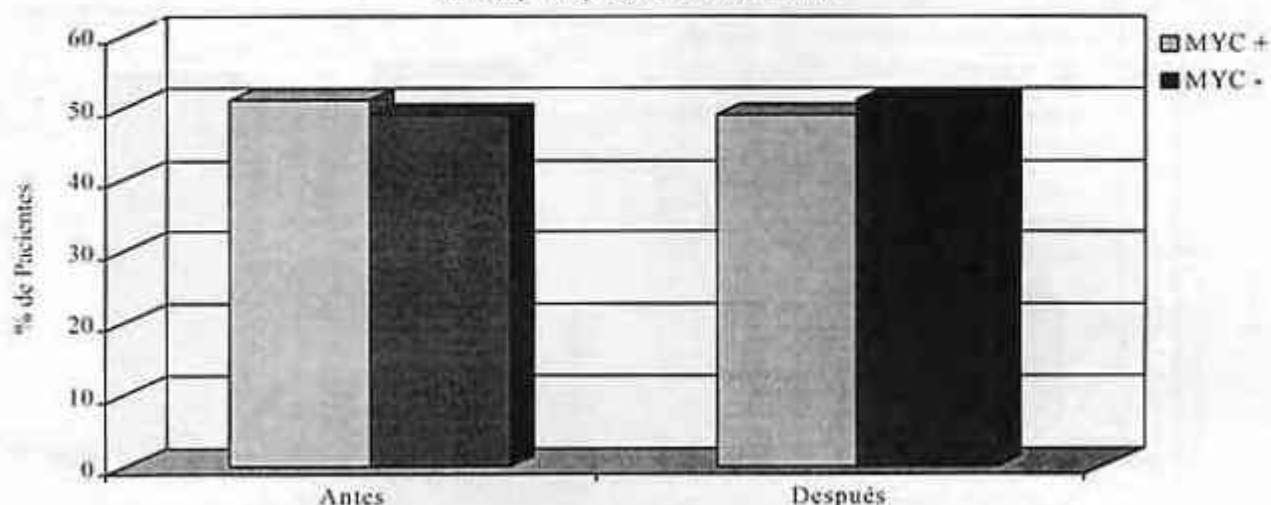
El oncogen myb es un factor de transcripción que comparte varias características con myc. Ambos comparten una localización nuclear y cooperan con los genes ras mutados para transformar células embrionales de ratón in vitro. En cuanto a su expresión en los tejidos, el gen myb parece ser mucho más restringido que myc, aunque ambos genes son diferencialmente expresados durante el crecimiento y la diferenciación celular. El gen myb es un gen regulado por mecanismos post-transcripcionales; codifica para una proteína de 600 aa (72 - 75 KD). Se ha observado que la proteína c-myb se encuentra asociada con la matriz nuclear.

La expresión anormal de este oncogen en procesos neoplásicos y en particular en cáncer de mama permanece aun sin ser dilucidada y probablemente actúe en forma conjunta con otros oncogenes.

3.11.- Evaluación de la expresión del oncogen c-myc en pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento

En el análisis de la expresión del oncogen c-myc en los tumores analizados antes del tratamiento (51% c-myc positivos y 49% c-myc negativos) y después del tratamiento (49% c-myc positivos y 51% c-myc negativos), se determinó que no existen una diferencia entre ambos grupos estudiados ($p>0,05$). (Gráfico N°. 3)

Gráfico 3
Evaluación de la Expresión del oncogen MYC en Pacientes con Cáncer de Mama
Antes y Después del Tratamiento



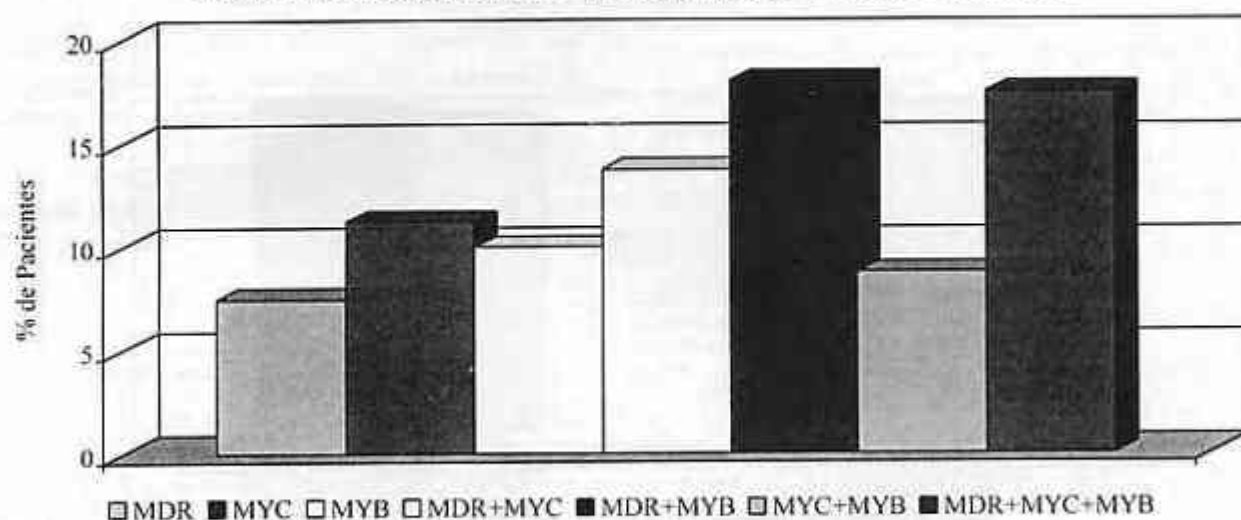
Hoy en día es ampliamente conocido que los oncogenes celulares son genes importantes involucrados en el desarrollo de cáncer humano. Los miembros de la familia de los genes myc comprenden: c-myc, N-myc y L-myc codifican para proteínas nucleares que aparentemente tienen propiedades biológicas similares, cuya función es regular la replicación del ADN y la transcripción de ARN. El resultado final de estas acciones a menudo es la potenciación de la proliferación celular o inhibición de la diferenciación terminal. El hecho que no haya variación significativa de los casos positivos antes y después del tratamiento indicaría que este oncogen no está directamente ligado a los cambios que puede inducir la terapia sino a la

evolución biológica propia de este tipo de tumores.

3.12.- Frecuencia de los oncogenes c-myc, myb y gen MDR-1 en tumores de mama

En los 80 tumores analizados antes del tratamiento se observó que existen pacientes que presentan un solo marcador: 7,5% de pacientes MDR-1 positivo, 11,25% c-myc y 10% myb+; en el grupo de pacientes con dos marcadores se observó lo siguiente: MDR-1 positivo y c-myc+ (13,75%), MDR-1 positivo y myb+ (18%), c-myc+ y myb+ (8,75%); el 17,5% de los pacientes presentaron los tres marcadores positivos (Gráfico Nº. 4).

Gráfico 4
Presencia de Oncogenes c-MYC - MYB y gen MDR1 en Tumores Mamarios

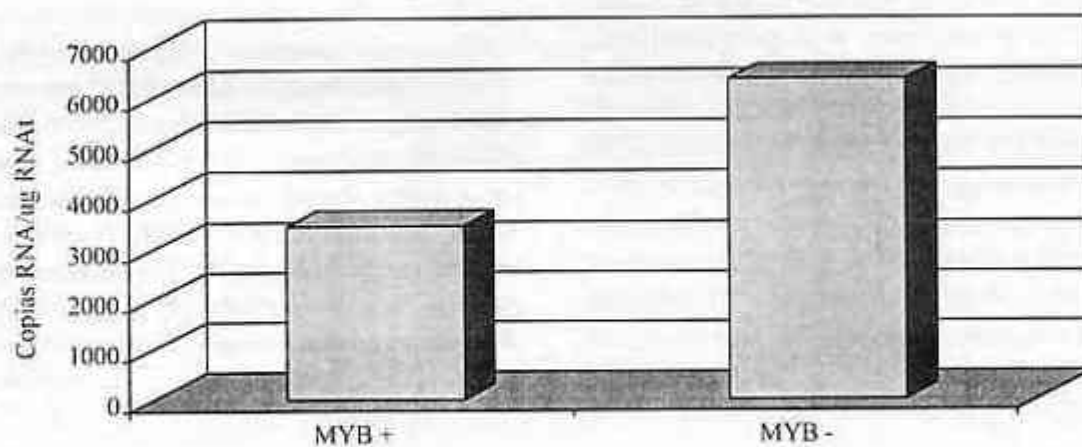


3.13.- Relación de la expresión del gen MDR-1 y el oncogen myb

En 38 tumores myb+ y 18 tumores myb-, se evaluó la sobreexpresión del gen MDR-1. En los tumores myb- se observó que existe una elevada expresión del gen MDR-1 (6335 copias

ARN/ug ARNt) en comparación a los tumores myb positivos (3444 copias ARN/ug ARNt); sin embargo las diferencias entre ambos grupos analizados no son estadísticamente significativas (Gráfico N°. 5). Estos datos indicarían que no existe relación funcional entre el gen MDR-1 y la expresión del oncogen myb.

Gráfico 5
Relación de la Expresión del Gen MDR1 y el Oncogen MYB



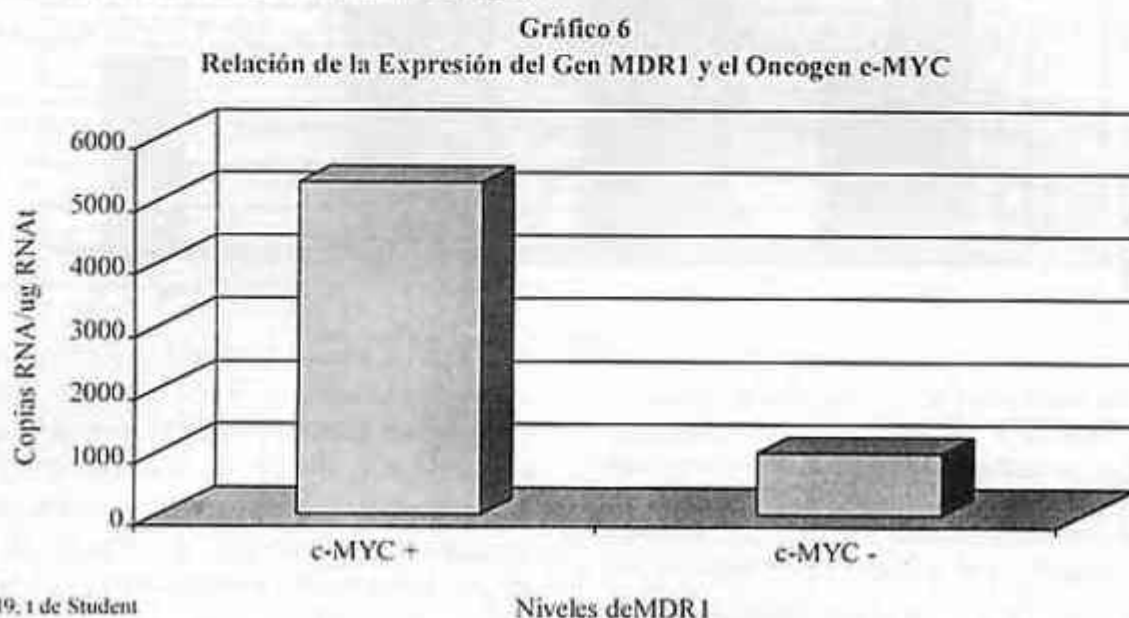
p=0.4610, t de Student

Niveles de MDR1

3.14.- Relación de la expresión del gen MDR-1 y el oncogen c-myc

En 38 tumores c-myc positivos y 17 tumores c-myc, se evaluaron los niveles de sobreexpresión del MDR-1. En los tumores que fueron c-myc positivos se observaron niveles elevados

de expresión del gen MDR-1 (5300 copias de ARN/ug ARNt), en comparación con los tumores que presentaron el oncogen c-myc negativo donde los niveles promedio del gen MDR-1 fueron de 1000 copias de ARN/ug ARNt ($p=0,0349$)(Gráfico Nº. 6).



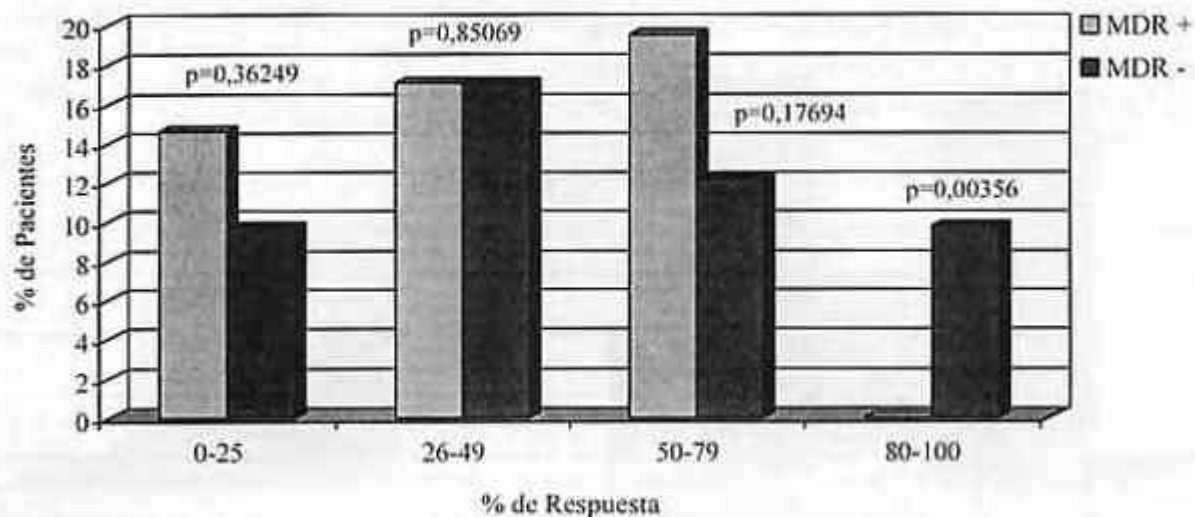
Estos resultados indicarían que existe cierta relación en cuanto a la expresión del oncogen c-myc y la sobreexpresión del gen MDR-1; sin embargo, deben analizarse otros parámetros para establecer su valor pronóstico y la contribución de ambos genes en la progresión del tumor.

3.15.- Relación de la expresión del gen MDR-1 y la respuesta al tratamiento

En 41 pacientes estudiados para el gen MDR-1 se pudo evaluar la respuesta al tratamiento. En el gráfico Nº. 7 se observa que el

14,63% de los pacientes MDR-1 positivo y el 9,7% MDR- tuvieron una respuesta al tratamiento entre 0-2% ($p=0,392$). El 17,07% de los pacientes MDR-1 positivo y el 17,07% MDR-1 negativo presentaron una respuesta entre el 26-49% ($p=0,8500$); el 19,51% de los pacientes MDR-1 positivo y el 12,19% de los pacientes MDR-1 negativo, respondieron entre un 50%-79% ($p=0,176$). Ningún paciente MDR-1 positivo alcanzó una respuesta entre 80-100% con respecto a 9,76% MDR-1 negativo ($p=0,0035$) (Gráfico Nº. 7).

Gráfico 7
Relación de la Expresión del Gen MDR1 y la Respuesta al Tratamiento

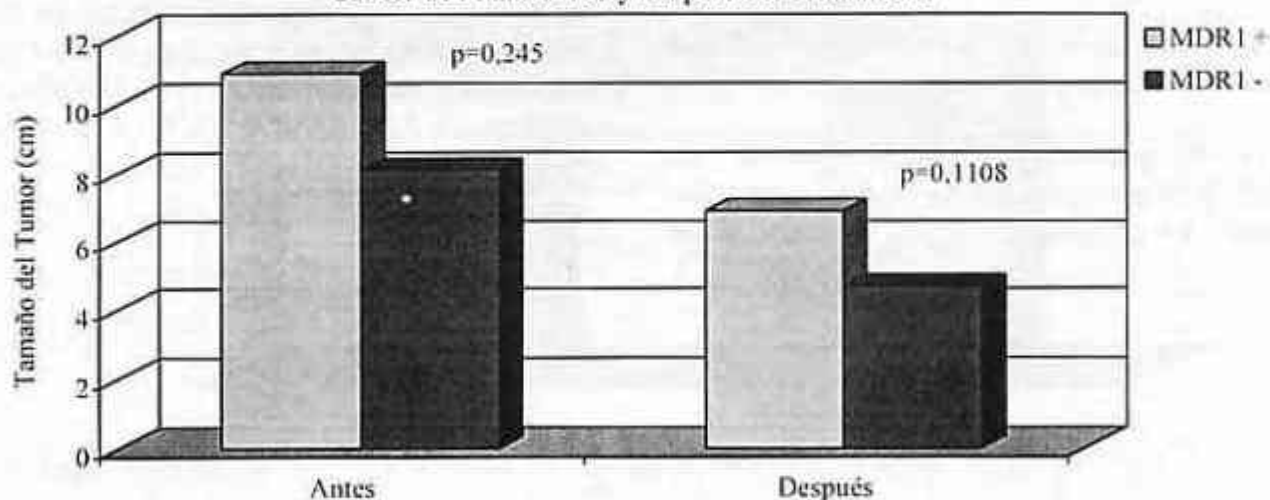


3.16.- Relación de la expresión del gen MDR-1 y el tamaño del tumor antes y después del tratamiento de pacientes con cáncer de mama

En la evaluación del promedio del tamaño del tumor en los pacientes del estudio antes y después del tratamiento en relación con la expresión del gen MDR-1 (Gráfico N°. 8), se observó que el tamaño del tumor con marcador MDR-1 positivo fue de 10,9 cm en compara-

ción a los tumores MDR-1 negativo que presentaron una media de 8,1 cm ($p=0,245$). Al analizar estos parámetros después del tratamiento, se observó una disminución del tamaño de los tumores MDR-1 positivo y MDR-1 negativo (6,9 cm y 4,7 cm, respectivamente); sin embargo, las diferencias entre ambos grupos analizados no fueron estadísticamente significativas ($p=0,110$).

Gráfico 8
Relación de la Expresión del Gen MDR1 y el Tamaño del Tumor en Pacientes con Cáncer de Mama Antes y Después del Tratamiento



El 1 de los pacientes estudiados después del tratamiento, se observó que el 82% (9/11) de los pacientes MDR-1 positivo, aumentaron, no modificaron o presentaron una reducción del tamaño del tumor < 10%, mientras que so-

lamente el 18% (2/11) de los pacientes MDR-1 negativo presentaron un comportamiento similar, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,00001$) (Tabla I).

Tabla I

Expresión del Gen MDR1 en Pacientes con Cáncer de Mama y el Tamaño del Tumor después del Tratamiento

Nº de Pacientes que Aumentaron o Disminuyeron < 10% el Tamaño del Tumor	Marcador MDR1 +	Marcador MDR1 -	Test de Fisher
11	82% (9/11)	18% (2/11)	$P < 0,00001$

Estos resultados indicarían que la mayoría de las pacientes bajo los esquemas terapéuticos empleados en el presente protocolo, donde se incluyen drogas relacionadas y no relacionadas con el fenotipo MDR-1, logran disminuir el tamaño promedio del tumor; sin embargo, existe un grupo pequeño de pacientes cuyos tumores sobreexpresan el gen MDR-1 y no sufren prácticamente ninguna reducción, probablemente porque estos tumores presentan un grupo considerable de células MDR-1 positivo que impiden la acción de la quimioterapia.

3.17.- Expresión del gen MDR-1 y la evolución clínica de los pacientes con cáncer de mama

Al analizar la expresión del gen MDR-1 en relación con la evolución clínica de los pacientes se observó que 8 de los pacientes viven sin enfermedad y 18 pacientes MDR-1 positivo murieron con enfermedad ($p = 0,00226$). En el grupo de pacientes que fueron MDR-1 negativo, 9 pacientes viven sin enfermedad y solamente uno murió con enfermedad ($p < 0,05$) (Tabla II). En el grupo de los pacientes muertos con la enfermedad se observó diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes positivos para MDR-1 (18/19) y negativos para el marcador biológico (1/19) ($p < 0,0001$).

Tabla II

Expresión del Gen MDR1 y la Evolución Clínica de los Pacientes con Cáncer de Mama

Expresión del Gen MDR1	Evolución Clínica del Paciente		Test de Fisher
	VSE	MCE	
MDR1 +	8	18	$P = 0,00226$
MDR1 -	9	1	$P < 0,05$

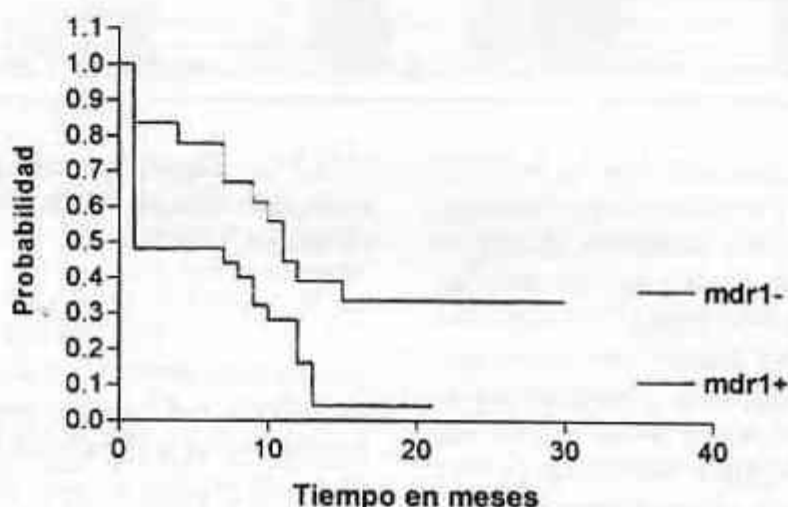
VSE: Vivo sin Enfermedad - MCE: Muerto con Enfermedad

3.18.- Expresión del gen MDR-1 y su relación con la sobrevida de los pacientes con cáncer de mama

En el gráfico N°. 9A se observa que las pacientes con tumores MDR-1 positivos presentan una probabilidad de sobrevida libre de en-

fermedad (SLE) significativamente menor a la del grupo de las pacientes con tumores MDR-1 negativos ($p=0,0363$). El análisis del riesgo relativo indicó que las pacientes MDR-1 positivas tiene un riesgo de recaída de 2,06 veces mayor que las pacientes MDR-1 negativas.

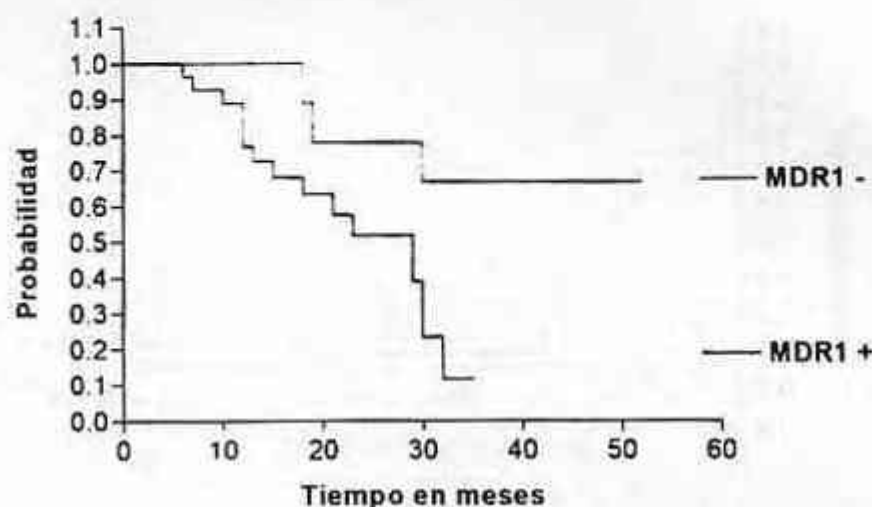
Gráfico 9 A
Sobrevida Libre de Enfermedad y su Asociación con la Expresión del Gen MDR-1 en Pacientes con Cáncer de Mama



La gráfica N°. 9B muestra que la sobrevida global (SG) de las pacientes MDR-1 negativo, es significativamente mayor con respecto a las pacientes con el marcador positivo ($p=0,0109$).

Las pacientes MDR-1 positivas tiene un riesgo relativo de morir de 4,3 veces con respecto a las pacientes con el marcador negativo.

Gráfico 9 B
Sobrevida Global y su Asociación con la Expresión del Gen MDR-1 en Pacientes con
Cáncer de Mama



3.19.- Expresión del oncogen myb y su asociación con la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama

En el gráfico Nº. 10A se observa que las pacientes con tumores myb positivos presentan una probabilidad de supervivencia libre de enfer-

medad (SLE) similar a la del grupo de las pacientes con tumores myb negativos ($p=0,527$).

La gráfica Nº. 10B muestra que la supervivencia global (SG) de las pacientes con tumores myb negativos y positivos no presentan diferencias significativas ($p=0,190$).

Gráfico 10 A
Sobrevida Libre de Enfermedad y su Asociación con la Expresión del Oncogen MYB
en Pacientes con Cáncer de Mama

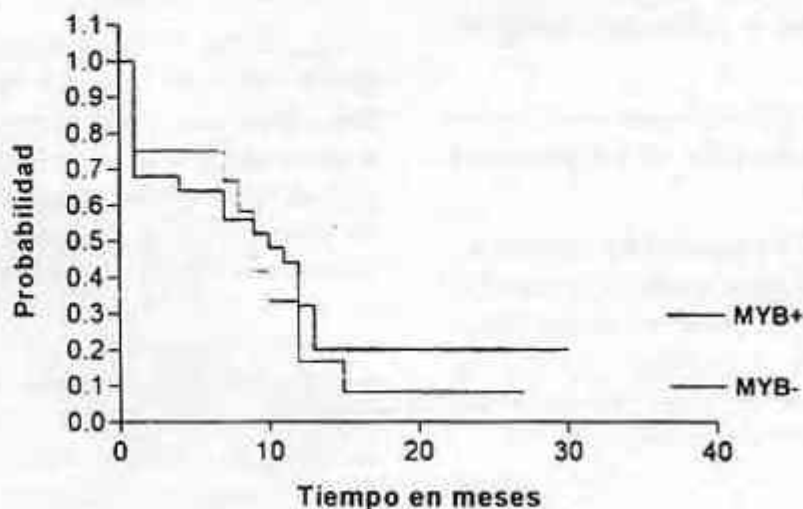
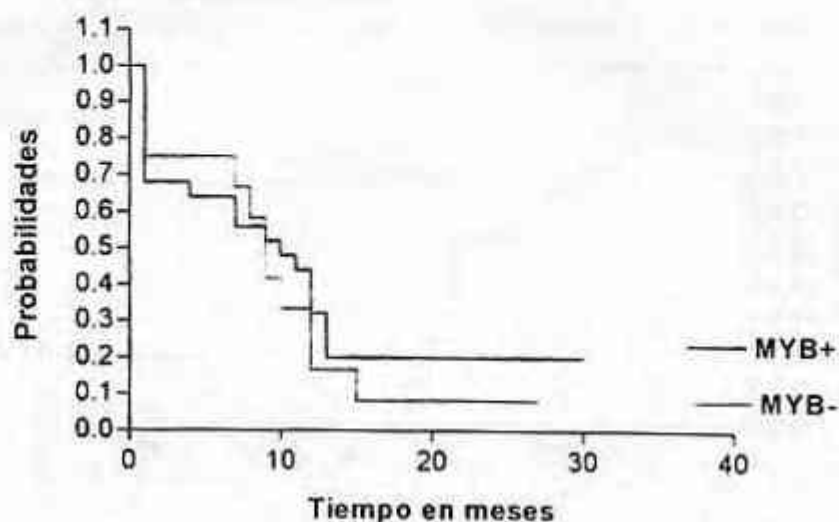


Grafico 10 B
Sobrevida Global y su Asociación con la Expresión del Oncogen MYB en Pacientes con Cáncer de Mama



El análisis de la supervivida libre de enfermedad y de la supervivida global en pacientes que presentaron el myb+ y myb- fue similar; sin embargo cabe destacar que de 16 pacientes que presentaron ambos marcadores positivo (myb+ y c-myc+) nueve murieron con enfermedad, 3 viven con enfermedad y solamente cuatro viven sin enfermedad.

3.20.- Expresión del oncogen c-myc y su asociación con la supervivida de las pacientes con cáncer de mama

En el gráfico N°. 11A se observa que las pacientes con tumores c-myc positivos presentan

una probabilidad de supervivida libre de enfermedad (SLE) similar a la del grupo de las pacientes con tumores myc negativos ($p=0,548$). El riesgo relativo de recaer en las pacientes con tumores c-myc positivo es 1,2 veces mayor que las pacientes con tumor c-myc negativo

La gráfica N°. 11B muestra que la supervivida global (SG) de las pacientes con tumores c-myc negativos y positivos no presentan diferencias significativas ($p=0,652$). El riesgo relativo de morir en las pacientes con tumor positivo para c-myc es 1,2 veces mayor que las pacientes con tumor c-myc negativo.

Gráfico 11 B
Sobrevida Libre de Enfermedad y su Asociación con la Expresión del Oncogen c-myc en Pacientes con Cáncer de Mama

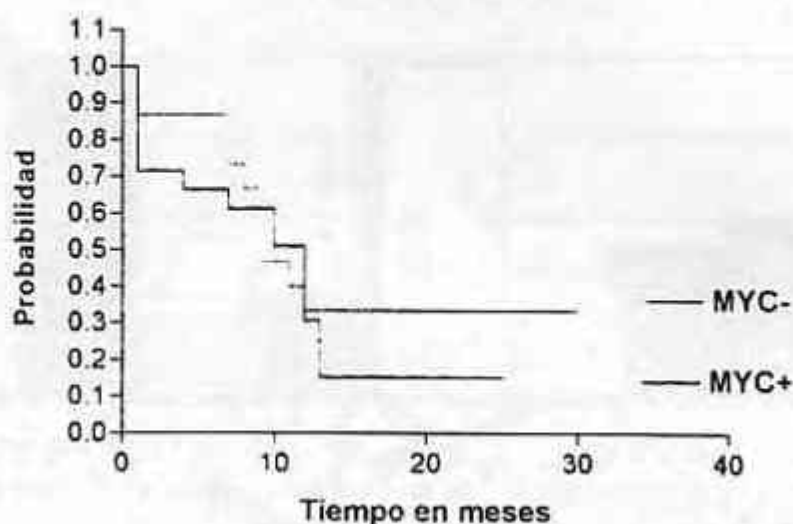
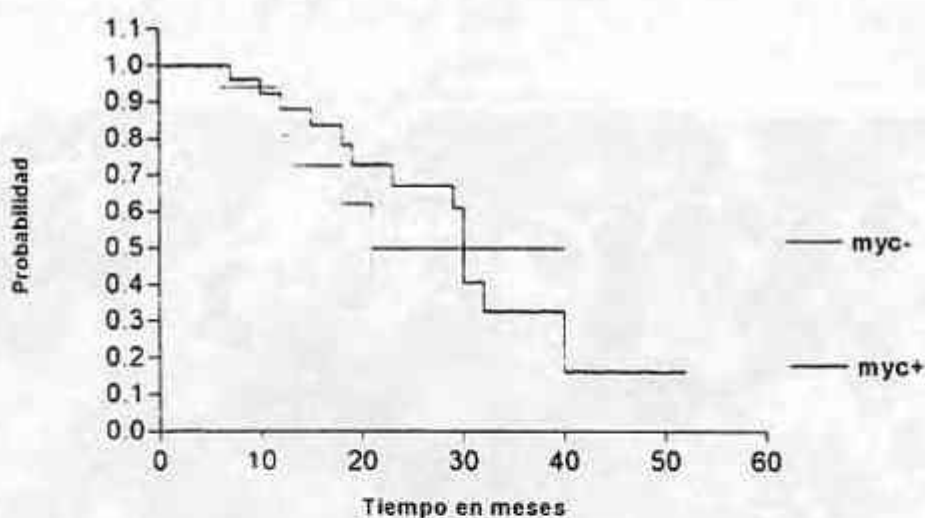


Gráfico 11 B
Sobrevida Global y su Asociación con la Expresión del Oncogen c-myc en Pacientes con Cáncer de Mama

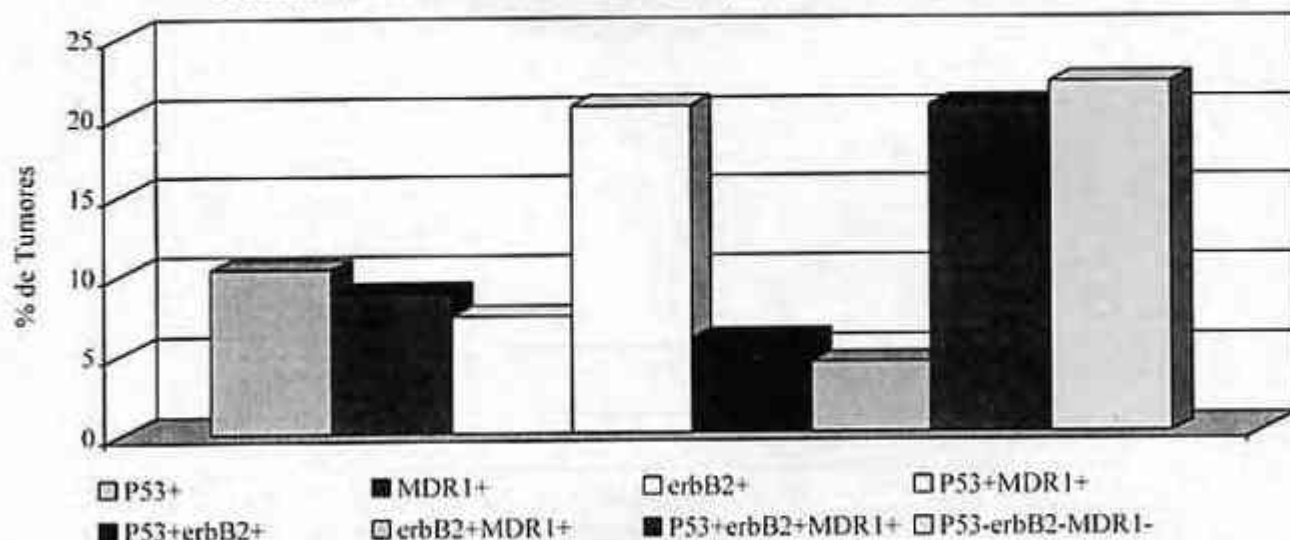


3.21.- Frecuencia de los marcadores MDR-1, P53 y erbB-2 en tumores de mama

En 68 tumores analizados por inmunocitoquímica se observó que existen pacientes que presentan un solo marcador: 10.29% de pacientes P53 positivos, 8.82% MDR-1 positivos y 7.35% erbB-2 positivos; en el grupo de pacientes con dos marcadores se observó lo si

guiente: P53/MDR-1 positivos (20.58%), P53/erbB-2 positivos (5.88%), erbB-2/MDR-1 positivos (4.41%); el 20.58% de los pacientes presentaron los tres marcadores positivos mientras que el 22.06% de las pacientes presentaron tumores negativos para estos marcadores (Gráfico Nº. 12).

Gráfico 12
Frecuencia de los Marcadores MDR1, P53 y erbB-2 en Tumores de Mama



En la Foto A se observa el marcaje intenso en la membrana plasmática en forma de mosaico, correspondiente a la interacción del anticuerpo anti erbB-2 con su antígeno correspondiente.

El marcaje de la P53 mutada es completamente diferente al del marcador erbB-2. Se presenta un intenso marcaje nuclear y comprende un gran número de células en el área del tumor de mama analizado (Foto B)

Foto A
Inmunocitoquímica erbB-2

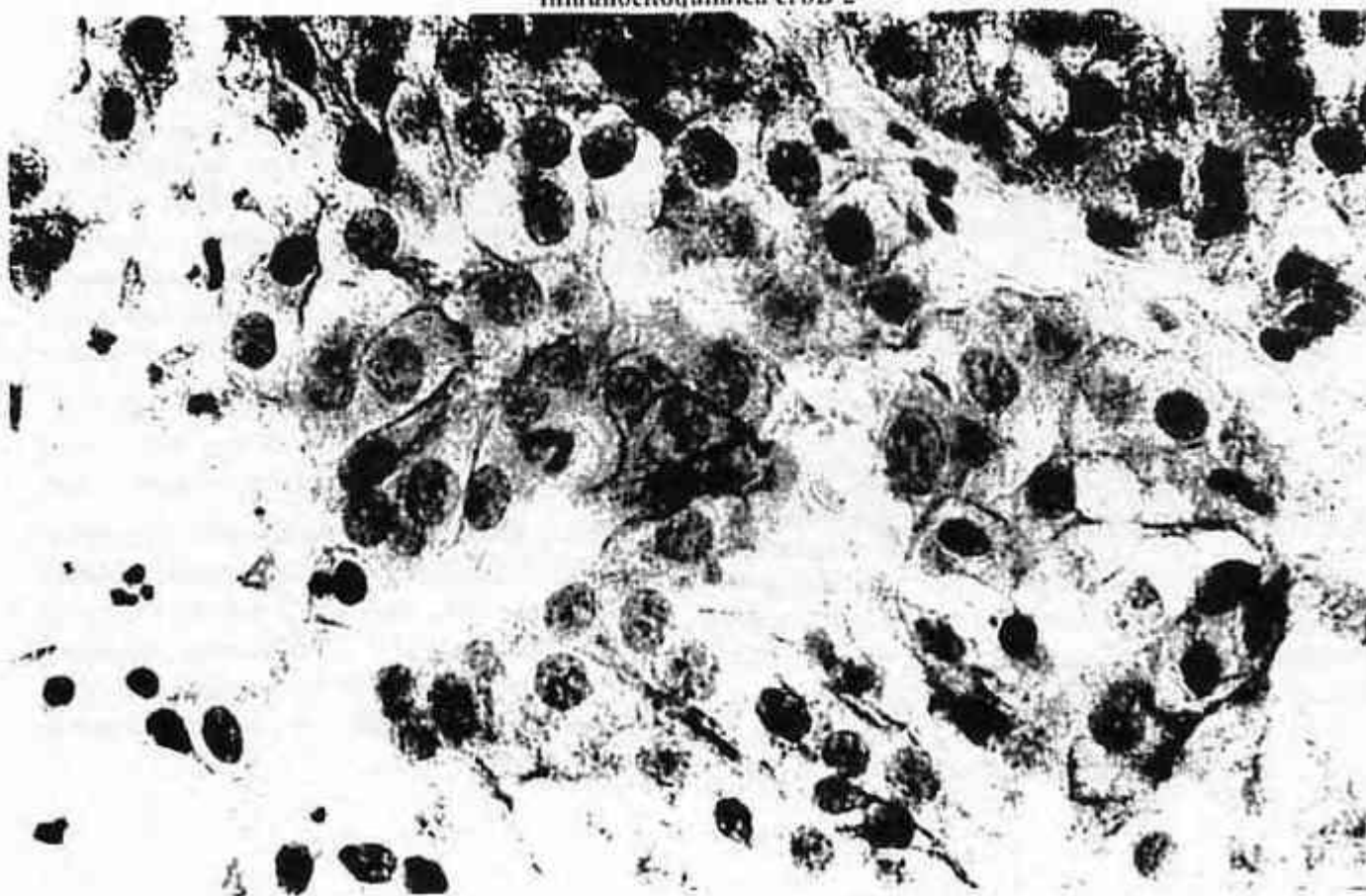


Foto B
Inmunocitoquímica P53 mutada



3.22.- Expresión del oncogen *erbB-2* y su asociación con la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama

En el gráfico Nº. 13A, se observa que las pacientes con tumores *erbB-2* positivos presentan una probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (SLE) similar a la del grupo de las pacientes con tumores *erbB-2* negativos ($p=0.830$).

La gráfica Nº. 13B, muestra que la sobrevida global (SG) de las pacientes con tumores *erbB-2* negativos y positivos no presentan diferencias significativas ($p=0.350$). El riesgo relativo de morir en las pacientes con tumor positivo para *erbB-2* es 1,5 veces mayor que las pacientes con tumor *erbB-2* negativo.

Gráfico 13 A
Sobrevida Libre de Enfermedad y su Asociación con la Expresión del Oncogen erbB-2 en Pacientes con Cáncer de Mama

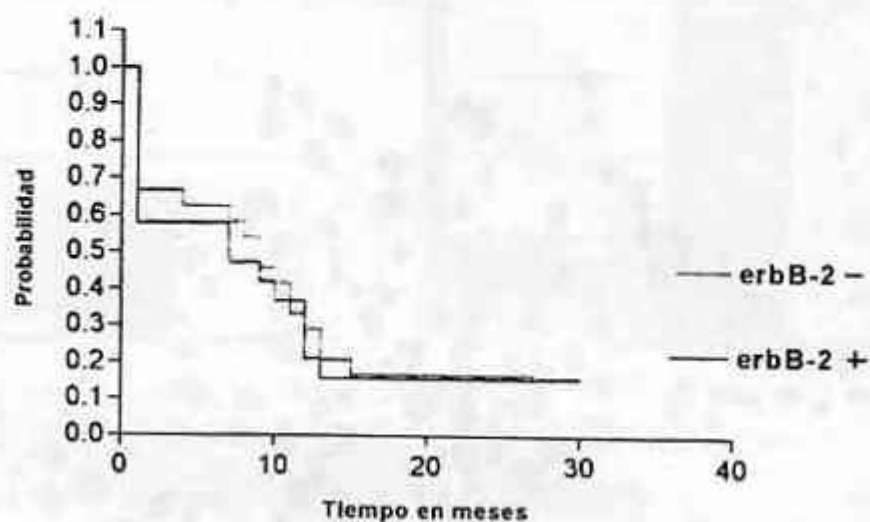
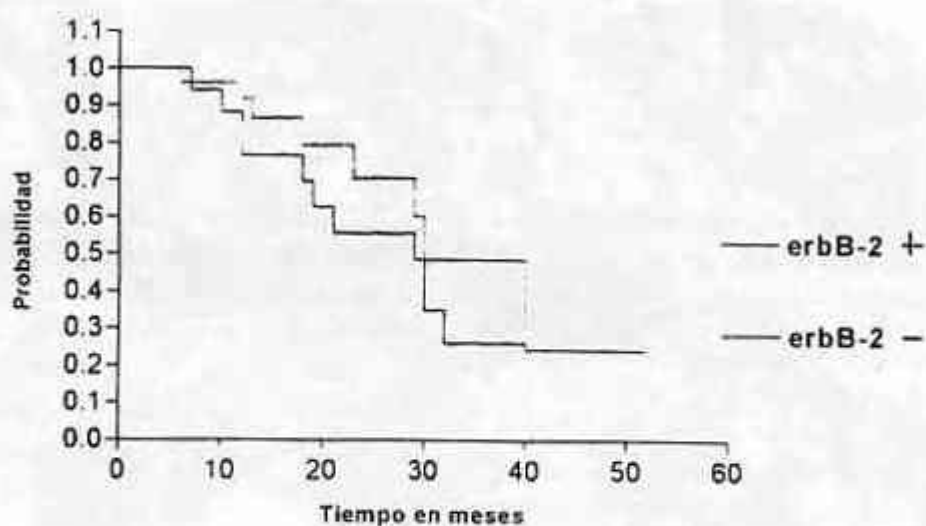


Gráfico 13 B
Sobrevida Global y su Asociación con la Expresión del Oncogen erbB-2 en Pacientes con Cáncer de Mama



Se ha podido demostrar que la extensión de metástasis a nódulos linfáticos, tamaño del tumor, estadio clínico, grado histológico y el estatus del receptor hormonal son indicadores pronóstico importantes en cáncer de mama.

La oncoproteína c-erbB-2 es un receptor del factor de crecimiento transmembrana con actividad tirosina quinasa, con un peso molecular de 185 kDa. La sobreexpresión de este oncogen se ha demostrado que es un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Generalmente su evaluación se realiza por métodos de inmunocitoquímica; empleando esta metodología existen reportes con resultados variables debido a la ausencia de métodos estandarizados con respecto a la fijación y preservación de las muestras, técnicas de tinción y criterios de diagnóstico.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Hirotaka y col. (1997), donde al evaluar la expresión de erbB-2 por inmunohistoquímica y por EIA no se observó asociación entre la sobrevida libre de enfermedad y erbB-2 como factor pronóstico. En cáncer de mama ha habido dificultad en determinar el valor

pronóstico de erbB-2 ya que probablemente se debieran establecer criterio unificados en cuanto a factor como extensión de metástasis a nódulos linfáticos y grado histológico, es decir pacientes con estadio clínico y patológico idéntico.

3.23.- Relación de la P53 mutada y la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama

En el gráfico Nº. 14A se observa que las pacientes con tumores P53 positivos presentan una probabilidad de sobrevida libre de enfermedad similar a la del grupo de las pacientes con tumores P53 negativos ($p=0,531$). El riesgo relativo de recaída es de 1,2 veces mayor en las pacientes con tumores P53 positiva que las pacientes con tumores P53 negativo.

La gráfica Nº. 14B muestra que la sobrevida global de las pacientes P53 negativa es significativamente mayor con respecto a las pacientes con el marcador positivo ($p=0,0029$). Las pacientes con tumores P53 positivo tienen un riesgo relativo de morir de 3,1 veces con respecto a las pacientes con el marcador negativo.

Gráfico 14 A
Sobrevida Libre de Enfermedad y su Asociación con el Gen P53 Mutado en Pacientes con Cáncer de Mama

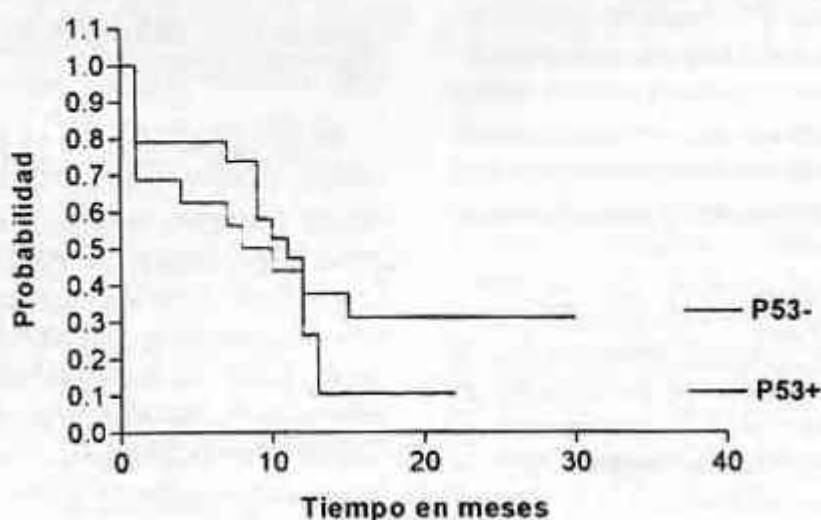
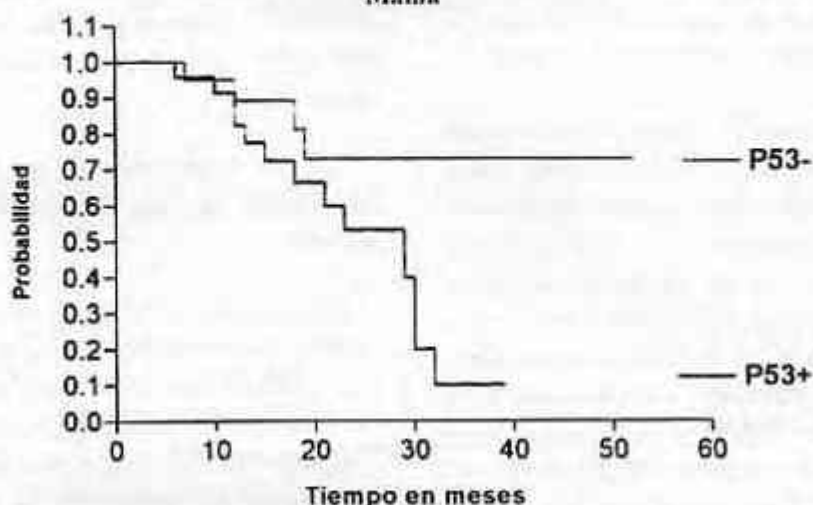


Gráfico 14 B
Sobrevida Global y su Asociación con el Gen P53 Mutado en Pacientes con Cáncer de Mama



Las células del tumor que han perdido la función normal de la P53 tienen una ventaja selectiva en el crecimiento y son más resistentes a las radiaciones ionizantes y a algunas drogas anticancerosas, las células con la P53 mutada se esperaría que fueran clínicamente más agresivas.

Las pacientes con tumores que presentan la P53 mutada se benefician menos de los regímenes de quimioterapia en comparación con las pacientes que presentan la P53 normal. Los resultados indican que existe una asociación con un pobre pronóstico en las pacientes con tumores que presentan P53 mutada, probablemente debido a la aumentada capacidad proliferativa de las células tumorales con P53 mutada o a la gran resistencia que presentan estas células tumorales cuyo crecimiento debería ser inhibido por una variedad de agente quimioterapéuticos.

Kovach y col. (1997) reportaron que de 32 pacientes que fueron P53+, 13 recayeron y 10 murieron en un periodo de seguimiento de 24 meses; de 58 pacientes sin P53 mutada solo 7 recayeron y 2 murieron. Concluyendo que la

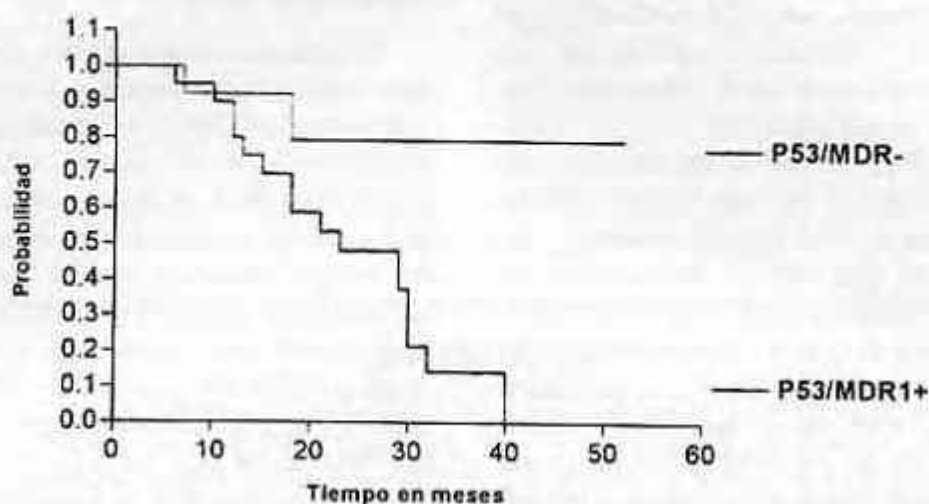
mutación esta fuertemente asociada con recaída temprana ($p=0,0008$) y con la muerte ($p<0,0001$).

En la población analizada en el presente estudio, se observó que de 26 pacientes con tumores con P53 mutada, 18 de las pacientes recayeron y murieron ($p=0,01148$). En el grupo de 15 pacientes con tumores P53-, se determinó que 4 de las pacientes murieron con la enfermedad y 11 pacientes viven sin enfermedad durante los meses de seguimiento.

3.25.- Relación de la P53 mutada/MDR-1 positivo y la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama

En el gráfico N°. 15 se observa que las pacientes con tumores P53/MDR-1 positivos presentan una sobrevida global significativamente menor con respecto a las pacientes con ambos marcadores biológicos negativos ($p=0,0117$). Las pacientes con tumores P53/MDR-1 positivo presentan un riesgo relativo de morir de 5,3 veces con respecto a las pacientes con P53/MDR-1 negativos.

Gráfico 15
Sobrevida Global y su Asociación con la Expresión del Gen MDR-1 y P53
Mutado en Pacientes con Cáncer de Mama



Recientemente se ha reportado que la expresión de la P-glicoproteína producto del gen MDR-1 y la P53 mutada están asociadas con un pobre pronóstico en cáncer de mama. La expresión de la P-gp con reactividad cruzada para varias drogas anticancerosas y las evidencias que la P53 mutada se encuentran involucradas en resistencia a drogas sugieren que ambos marcadores tienen una relevancia en el seguimiento de pacientes con cáncer de mama. Se han reportado experimentos in vitro que muestran que la P53 mutada puede activar el promotor del gen MDR-1. (Linn y col, 1996).

Linn y col. (1996), utilizaron la inmunohistoquímica para investigar la coexpresión de la Pgp y la acumulación de la P53 nuclear en pacientes con quimioterapia neoadyuvante con Doxorubicina y Ciclofosfamida, observando que la expresión de la P-gp y la acumulación nuclear de la P-53 a menudo ocurre en forma concomitante en la mismas células tumorales. Esta co-expresión fue mas frecuentes en los cánceres de mama localmente avanzados, los

cuales son carcinoma que se conoce que tienen pobre pronóstico.

En este estudio las pacientes con coexpresión de P53 y P-gp presentaron un factor pronóstico pobre y una supervivencia global mas corta.

POSIBLE APLICABILIDAD Y USO DE LOS RESULTADOS

Este tipo de investigación permitirá en un futuro cercano, determinar eficazmente la aplicación de esquemas terapéuticos más racionales, adecuados a la variabilidad que se puede presentar en la respuesta del tumor al tratamiento. Este planteamiento es factible si se mantiene una estrecha vigilancia del surgimiento del fenotipo MDR-1, principalmente en los esquemas que utilizan agentes relacionados con la P-gp170.

Actualmente ya existen protocolos con drogas que revierten el efecto MDR-1 ó lo inhiben como el caso del Tamoxifen. Estas nuevas drogas abren un camino hacia la quimioterapia

con una definición previa de combinado terapéutico que debe ser suministrado al paciente.

En el presente estudio se observó que un marcador importante a ser analizado en cáncer de mama es la P53 mutada, ya que se observa diferencias significativas en la sobrevida libre de enfermedad en los pacientes con P53 mutada positiva y P53 negativa, igualmente este parámetro se modifica aún mas cuando se analiza en conjunto la P53 mutada positiva y la sobreexpresión del gen MDR-1. Debido a que la glicoproteína-P juega un papel importante en la multiresistencia a drogas, el nivel de expresión de la misma, ha sido tomado como un factor pronóstico de importancia para la respuesta quimioterapéutica, la sobrevida libre de la enfermedad y sobre todo sobrevivencia como tal (Bartlett. N. y col., 1994).

Por consiguiente, es evidente que es necesario instrumentar metodologías adecuadas para el análisis del fenotipo MDR, debido a su frecuente aparición en este tipo de tumores. Por otra parte, la hibridación molecular, permite determinar los niveles de expresión del ARNm, encontrándose que aquellos tumores que presentan elevados niveles de expresión del mismo, generalmente son resistentes a los quimioterapéuticos, lo cual puede ser a su vez corroborado con pruebas de RT- RCP e inmunocitoquímica, tal como ya ha sido demostrado.

Aunque eventualmente la determinación de la quimioresistencia en pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico no se realiza frecuentemente en los protocolos con drogas antineoplásicas, es necesario el uso de las metodologías adecuadas para el análisis temprano del fenotipo MDR, debido a su usual aparición en diferentes tumores provenientes de pacientes que han recibido quimioterapia. Este tipo de estudios permitirán establecer las bases para el suministro más racional de las drogas y uso de los moduladores adecuados. Dichos esfuerzos serán dirigidos al mejoramiento de la condición

clínica de los pacientes y una probable disminución del impacto económico que se presenta debido al elevado costo de las distintas drogas quimioterapéuticas.

Algunas estrategias pueden ser incorporadas para aplicar la información acerca de la expresión del gen MDR-1 en estudios clínicos, para determinar si los niveles de ARN MDR-1 son pronósticos para la respuesta del tumor a la quimioterapia, muestras pre- y post-tratamiento del mismo paciente pueden ser evaluadas y correlacionar la respuesta clínica. Una vez establecida la correlación, la información del nivel de expresión puede ser usada en la selección del agente quimioterapéutico. Si el nivel del ARNm MDR-1 es bajo, se pueden elegir drogas afectadas por el fenotipo MDR y monitorear la expresión del gen MDR-1 durante el tratamiento para determinar el posible desarrollo de multiresistencia, lo cual puede sugerir la eliminación de las drogas MDR y usar agentes alternativos a los cuales la P-gp no confiere resistencia. Si los niveles de ARN MDR-1 son altos se pudieran eliminar estos agentes del régimen de tratamiento inicial (Goldstein. L. y col., 1991).

Es importante tomar en cuenta que otros factores tales como pobre vascularización del tumor, un pH desfavorable, baja tasa de crecimiento, y alta presión intersticial intratumoral, pueden jugar un papel importante en la determinación de un pobre pronóstico del tumor a la quimioterapia en general (Linn. S. y col., 1994).

El "refinamiento" de estas técnicas puede hacer posible, estudiar la localización celular y cuantificación de la expresión celular del producto del gen MDR-1 y de otros agentes relacionados a la resistencia, en células individuales y en tumores; lo cual ofrecería la oportunidad de estudiar la heterogeneidad dentro del tumor. En términos de estudios clínicos merece tomar en cuenta la coexistencia de otros mecanismos de resistencia, debido a que cada uno

de ellos puede ofrecer oportunidades separadas para la modulación de la resistencia a drogas, por ello es crucial que se produzca una estrecha colaboración entre investigadores y clínicos (De Vries y Pinedo, 1991).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue realizado mediante el financiamiento otorgado por CONICIT, proyecto S1-2518.

BIBLIOGRAFIA

1. Bartlet, N., Lum, B., Fisher, G., Brophy, N., Ehsan, M., Halsey, J. And Sikik, B. Phase I trial of Doxorubicin with Cyclosporine as a Molecular of Multidrug Resistance. *Journal of Clinical Oncology*. 1994; 12/4: 835-842.
2. Cordon-Cardo, C., O'Brien J., Casals, D., Ritman Graver, L., Briedler, J. Melamed, M., and Bertino, J. Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endphelial cells at blood brain barrier sites. *Medical Science*. 1989., 86: 695-698
3. De Vries, E.G.E., and Pinedo, H.M., Clinical implications of resistance to chemotherapy. In *Molecular and Clinical advances in anticancer drug resistance* (Ozols R. Ed.), pp 171-186. Kluwer Academic Publisher, 1991
4. Goldstein L., Gottesman, M., Pastan, I. Expression of the MDR-1 gene in human cancer. In *molecular and clinical advances in anticancer drug resistance* (Ozols R., Ed), pp: 101-119. Kluweer Academic Publisher, 1991
5. Hayes, J. And Wolf, R. Molecular Mechanisms of drug resistance *Biochem J.*, 1990; 272:281-295.
6. Linn, S., Van Kalken, C., Van Tellingen, O., Van der Valk, P., Van Groeningen, C., Kuiper, C., Pinedo, H., and Giaccone, G., Clinical and pharmacology study of multidrug reversal with vinblastine and Bepridil. *Journal of clinical oncology*. 1994; 12/4:812-819.