

RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS: GENÉTICA E FISIOLOGIA DA GLICOPROTEÍNA P

Mutidrug resistance: genetic and physiology of protein P

MARION SCHIENGOLD¹ ANA LÍGIA LIA DE PAULA RAMOS² CLÁUDIA ENK DE AGUIAR¹
GILBERTO SCHWARTSMANN³ NANCE BEYER NARDI¹

Um dos maiores desafios na quimioterapia do câncer é evitar a resistência a múltiplas drogas (MDR). Células que expressam MDR possuem resistência cruzada a vários agentes naturais não relacionados estruturalmente. Nesta revisão, os autores discutem aspectos moleculares do fenômeno MDR, destacando os principais mecanismos responsáveis pela falha da quimioterapia. São discutidas a genética, a estrutura e a função da glicoproteína P.

Unitermos: Glicoproteína P, MDR, quimioterapia, resistência a múltiplas drogas.

Keywords: (P glycoprotein), MDR, chemotherapy, multidrug resistance.

1 - Depto de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2 - Depto de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3 - SOAD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

Resistência a drogas

As células tumorais são capazes de desenvolver resistência a uma ampla variedade de agentes antineoplásicos. Diferentes fatores podem interferir no resultado de um regime quimioterápico, tornando-o falho ao induzir uma resposta. O primeiro dentre eles é a inabilidade das drogas em alcançar o seu alvo celular crítico. Neste sentido, fatores fisiológicos, como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, são ingredientes chaves de uma quimioterapia bem-sucedida.

Embora não se possa negar a grande importância dos fatores fisiológicos, a maioria dos pesquisadores tem concentrado sua atenção nos fatores celulares que levam à falha dos regimes quimioterápicos, por serem estes os de mais difícil identificação e conseqüentemente de mais difícil solução.

Resistência clínica à quimioterapia pode ser definida como falta de resposta inicial ao tratamento ou resposta inicial seguida de progressão da doença após quimioterapia.

Neste contexto, a resistência a drogas tem sido classifica-

Endereço para correspondência: Depto de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Cx. Postal 15053 - 91501-970, Porto Alegre, RS.

da em duas categorias distintas, inerente ou adquirida. Nos casos onde a resposta total à quimioterapia tem sido historicamente pobre, tais como o câncer de cólon e o câncer de células não-pequenas de pulmão, esses tumores são considerados como possuidores de resistência inerente ou "de novo" à quimioterapia. Isto contrasta com a situação observada nas leucemias ou linfomas, em que os pacientes inicialmente respondem à quimioterapia, mas tornam-se progressivamente refratários a um tratamento posterior com as mesmas drogas. Nestes casos, eles são considerados como portadores de resistência adquirida.

Tumores com uma lenta taxa de crescimento, tais como os carcinomas de cólon, têm um maior grau de heterogeneidade celular do que os tumores que são caracterizados por uma rápida taxa de crescimento. Dentro de um tumor nem todas as células têm o potencial para a auto-renovação. Aqueles que apresentam este potencial são chamadas células tronco. Os tumores com maior fração de crescimento contêm muitas vezes mais células tronco do que aqueles com crescimento lento. É interessante notar que os tumores mais sensíveis à quimioterapia tendem a ser aqueles caracterizados por uma taxa de crescimento rápido. Também tendem a ser rapidamente espalhados e, em ausência de terapia sistêmica, são rapidamente fatais.

De acordo com *Goldie e Coldman*, 1983, quando a população de células tronco dentro de um tumor é pequena, este deve sofrer muito mais duplicações antes de alcançar um tamanho clinicamente detectável. Durante tal crescimento lento, muitas linhagens celulares irão se diferenciar e morrer, enquanto aquelas que sobreviverem serão as que mais provavelmente sofrerão mutações em direção à resistência.

Tais descobertas indicam que os tumores inerentemente resistentes à quimioterapia e aqueles com resistência adquirida podem na realidade estar operando através dos mesmos eventos mutacionais. No primeiro caso, os fenótipos resistentes representam a maioria dos tipos celulares no tumor, enquanto no último eles podem representar somente uma pequena fração total da população celular presente no início da terapia.

Os mecanismos de resistência celular a drogas são múltiplos, variando de acordo com a classe de agentes utilizados. Dentre os principais mecanismos de resistência a drogas em nível celular podem ser destacados:

A - Alterações na membrana celular: mudanças de membrana celular podem reduzir a concentração intracelular da droga, levando à resistência. Isto pode ocorrer, tanto por uma redução no influxo da droga, como por um aumento no efluxo. Nestes casos, haveria alterações no número de moléculas protéicas de transporte e/ou modificações nestas moléculas. Estes processos estão comumente relacionados com a superexpressão de uma glicoproteína de membrana, depen-

dente de energia, denominada de glicoproteína P (ou PGP), onde P se refere à permeabilidade. Outras proteínas transportadoras de drogas e pertencentes à mesma superfamília da glicoproteína P vêm sendo estudadas com relação ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas, sendo chamadas de MRP as proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (*Kuiper e cols.*, 1994; *Burger e cols.*, 1994; *Abbaszadegan e cols.*, 1994).

B - Alterações no metabolismo da droga: aqui são incluídas a redução da conversão de uma pró-droga em droga ativa e a desintoxicação aumentada da droga. Com relação a esta última, o glutatíon e suas enzimas associadas representam um sistema metabólico que pode ter um grande impacto sobre a eficiência de certas drogas anticancerígenas. Agentes alquilantes conjugam com glutatíon através da enzima glutatíon S transferase. Elevações na quantidade de glutatíon e glutatíon S transferase têm sido registradas em linhagens celulares tumorais que são resistentes a agentes alquilantes (*Bellamy, Dalton e Dorr*, 1990).

C - Alterações no alvo da droga: muitas vezes as drogas têm como alvo enzimas relacionadas à duplicação celular. Alterações enzimáticas que diminuam a possibilidade de interação com a droga podem tornar as células resistentes. A concomitante diminuição de afinidade com o substrato normal da enzima pode ocorrer ou não. Outro fenômeno frequentemente observado é o aumento dos níveis da enzima-alvo, muitas vezes associado à amplificação do gene que a codifica.

D - Aumento nos níveis de reparo do dano induzido pela droga: muitos dos agentes citotóxicos usados nos regimes quimioterápicos são sabidamente causadores de danos no DNA. Desde que o DNA é o principal alvo citotóxico para agentes alquilantes e intercalantes, bem como para metais pesados, não é surpreendente que células tumorais possam adquirir resistência a drogas devido a uma atividade aumentada do sistema de reparo. Diferentes linhagens celulares deficientes em reparo são extremamente sensíveis a agentes alquilantes e metais pesados. Por outro lado, em um número de linhagens celulares resistentes aos mesmos agentes e também a radiações, tem-se encontrado evidências de maior ativação do sistema de reparo do DNA. Há evidências de que a sensibilidade aos quimioterápicos pode ser restaurada através de inibidores de enzimas que participam do reparo (*Fairchild e cols.*, 1990).

Cabe ressaltar que, em muitos casos, mais de um mecanismo de resistência está implicado na falha de regimes quimioterápicos. Em cada caso, na maioria das vezes um único mecanismo de resistência não é suficiente para explicar o observado. Em resposta ao estresse citotóxico algumas células podem ser capazes de alterar a expressão de uma bateria de genes envolvidos no metabolismo ou no efluxo das drogas.

A maioria dos quimioterápicos interage com as fases do

ciclo mitótico para inibir, interromper ou letalmente acabar com a divisão celular. Desde que a célula normal em crescimento é mitoticamente similar à célula neoplásica, as diferenças entre tecidos cancerosos e normais, em resposta à quimioterapia, são quantitativas e não qualitativas.

De acordo com *Reed*, 1991, a resistência clínica aos agentes que danificam o DNA não é simplesmente um fenômeno da célula tumoral e pode refletir a habilidade dos indivíduos em proteger o DNA.

A resposta à quimioterapia é uma interação complexa entre o tumor (que afeta o hospedeiro), a droga (que afeta o tumor e o hospedeiro) e os fatores do hospedeiro que podem regular o crescimento do tumor por mecanismos imunológicos ou endócrinos. A atividade precisa dos quimioterápicos no ciclo celular não é de simples determinação. Poucos agentes são específicos a uma única fase do ciclo celular. Mais comumente cada agente será ativo em muitas fases simultaneamente. Em adição, a letalidade é geralmente dose-dependente e as características cinéticas das populações de células podem mudar em resposta ao tratamento quimioterápico (*Goldie*, 1992). Neste artigo serão discutidos aspectos relacionados ao fenômeno MDR.

A MDR e a glicoproteína P

Os mecanismos celulares de resistência, conforme já aludido, não são mutualmente exclusivos. Até mesmo uma única célula pode apresentar vários mecanismos. Além disso, alternativamente, um determinado mecanismo pode conferir resistência a múltiplas drogas. Em um sentido amplo, resistência a múltiplas drogas (MDR) se refere às células tumorais que, quando selecionadas para resistência a um único agente, simultaneamente desenvolvem resistência cruzada a muitos outros agentes diferentes estruturalmente (*Fairchild e cols.*, 1990).

Embora muitos mecanismos diferentes possam estar envolvidos na produção do fenótipo MDR, o mecanismo de resistência que tem suscitado maior interesse é o associado com a superexpressão de uma glicoproteína de membrana conhecida como glicoproteína P (Pgp). A expressão aumentada da glicoproteína P na membrana plasmática é a mudança mais consistente detectada em células resistentes a múltiplas drogas (*Endicott e Ling*, 1989).

A MDR foi observada na década de 60, quando *Kessel* constatou que células leucêmicas murinas (P388), selecionadas para resistência à vimblastina, apresentavam resistência cruzada à actinomicina D, alcalóides de vinca, daunorubicina e derivados de tereftalanilídeos (*Kessel e cols.*, 1965 e 1968). Nestas células o decréscimo no acúmulo de drogas era paralelo ao seu grau de resistência. Fenômenos similares foram observados em 1970 por *Biedler e Riehm* e por *Bech-*

Hansen e cols., em 1976, em estudos com hamster chinês. Em 1976, *Juliano e Ling*, estudando uma linhagem celular pleiotropicamente resistente e com decréscimo no acúmulo de drogas, resolveram investigar as membranas destas células e identificaram uma glicoproteína altamente amplificada de aproximadamente 170kDa. Diferentes linhagens celulares resistentes a drogas apresentam glicoproteína P cujo tamanho pode variar de 130 a 190kDa. A variação na glicosilação nestas proteínas pode explicar em grande parte a variabilidade encontrada no tamanho das mesmas. O tamanho mais comumente observado (140kDa) corresponde a uma sequência de aproximadamente 1.280 aminoácidos. Estas proteínas consistem de duas metades homólogas de igual comprimento. Cada metade contém um conjunto de seis regiões hidrofóbicas que são domínios potenciais, formando um canal transmembrana. Estas duas metades no entanto diferem substancialmente uma da outra em humanos, devido a grandes variações na localização dos íntrons. Isto sugere possível evolução independente das duas metades ou alternativamente um grande rearranjo das estruturas após um evento de duplicação. Os resíduos glicosilados se ligam à parte externa da membrana, perto da região N terminal. A glicoproteína P é modificada pós-transcricionalmente por glicosilação e fosforilação. A glicosilação aparentemente não afeta a sua função, enquanto existem indicações de que a fosforilação tem importância na regulação dos níveis de resistência (*Gottesman e Pastan*, 1993). Além disso, a análise de sequência indica um sítio de ligação com o ATP em cada metade da proteína, na porção C terminal do lado citoplasmático. A hidrólise do ATP está envolvida no fornecimento de energia para o efluxo da droga.

A glicoproteína P parece ser capaz de adotar duas ou mais conformações. Sendo assim, a hidrólise do ATP seria responsável pelo controle da transição entre as diferentes formas possíveis. A conformação final deve ter afinidade razoavelmente reduzida com o composto para que a glicoproteína P possa atuar como uma bomba de efluxo (*Ferguson e Baguley*, 1993). Com relação ao mecanismo de ação do transportador de múltiplas drogas, recentemente tem sido sugerido que este tanto pode atuar no aumento do efluxo quanto na redução do influxo das drogas. O modelo corrente do mecanismo de ação da Pgp tem duas características principais. A mais marcante é de que as drogas podem ser detectadas e expelidas à medida que entram na membrana plasmática, efeito que explica o menor acúmulo das drogas no citosol. A segunda característica importante é que o transporte ocorre através de um único canal, composto de uma ou mais subunidades de 170kDa. Mesmo assim, diferentes drogas podem entrar no transportador de diferentes maneiras, já que as regiões de contato inicial podem variar (*Gottesman e Pastan*, 1993).

Vários grupos têm identificado seqüências de DNA amplificadas em linhagens celulares resistentes a múltiplas drogas (Riordan e cols., 1985; Gros e cols., 1986; Meyers e cols., 1985; Van der Bliek e cols., 1986). Estas amplificações estavam presentes tanto como regiões de coloração homogênea ou como cromossomos duplo-minuto. Roninson e cols. em 1984, verificaram que as regiões amplificadas em uma linhagem celular de hamster chinês apresentavam uma forte correlação com a resistência a múltiplas drogas nesta linhagem. Fojo e cols., em 1985, demonstraram que quatro linhagens celulares diferentes de carcinoma humano resistentes à droga compartilhavam regiões amplificadas entre si, que por sua vez não eram encontradas nas linhagens correspondentes sensíveis à droga. Estas seqüências amplificadas continham uma família de vários genes relacionados, entre eles o que codifica para Pgp. Estudos recentes têm demonstrado que linhagens celulares MDR podem ser selecionadas sem a amplificação do DNA ou RNA para a glicoproteína P, mas somente com baixos níveis de resistência. Seleção subsequente para altos níveis de resistência resulta na amplificação do DNA e na superexpressão do RNA mensageiro. Embora a observação mais freqüente seja níveis de proteína e RNA mensageiro aumentados como resultado da amplificação do DNA, aumento na expressão da proteína e do RNAm pode ocorrer sem a amplificação do gene para Pgp. Isto sugere que a glicoproteína P pode ser regulada transcricionalmente e/ou em nível de tradução (Endicott e Ling, 1989).

Genética da Pgp

Os genes da Pgp pertencem a uma família gênica altamente conservada em humanos e roedores. Dois membros, MDR1 e MDR3, têm sido identificados em humanos, enquanto em camundongos e hamster, três genes. No hamster estes genes têm sido chamados Pgp1, Pgp2 e Pgp3 e no camundongo, mdr1, mdr2 e mdr3. O gene MDR1 humano apresenta maior homologia com o Pgp1 do hamster, enquanto o MDR3 é homólogo a Pgp3. Até o momento, o homólogo humano do Pgp2 do hamster não foi encontrado e pode ter sido perdido durante a evolução (Lincke e cols., 1991). Os genes mdr1 e mdr2 de camundongo são altamente homólogos aos genes Pgp2 e Pgp3 do hamster. Estes genes provavelmente são o resultado de eventos de duplicação gênica. Análises de seqüência sugerem que os genes Pgp1 e Pgp2 e os dois genes para Pgp humanos estejam sofrendo evolução em concerto.

A despeito do alto grau de similaridade estrutural, as isoformas de glicoproteína P são funcionalmente diferentes e têm padrões de expressão distintos. Assim, transfecção de cDNAs derivados de genes de camundongos e humanos para células sensíveis a drogas tem mostrado que o MDR1 huma-

no e o mdr3 e mdr1 de camundongo conferem fenótipos resistentes a múltiplas drogas qualitativamente similares, incluindo resistência a drogas estruturalmente diferentes, que não compartilham um alvo comum, como alcalóides de vinca, antraciclina e actinomicina D (Lincke e cols., 1991). O mdr2 murino e o MDR3 humano (expressão mais restrita que o MDR1) estão envolvidos no transporte de lecitinas para a bile (Smit e cols., 1994).

O MDR1 e o MDR3 humanos codificam seqüências 76% idênticas a despeito de suas habilidades diferentes em transportar drogas. O mdr3 de camundongo e o MDR1 humano, com função similar, são 88% idênticos a despeito dos 50 milhões de anos ou mais de evolução. As regiões mais conservadas evolutivamente são aquelas de ligação com ATP (Gottesman e Pastan, 1993). Ambos consistem de 28 exons, 27 dos quais contêm seqüências codificadoras que se correlacionam com domínios funcionais. Os íntrons são posicionados em sítios homólogos entre as regiões codificadoras (Lincke e cols., 1991).

No hamster a situação é diferente; Pgp1 e Pgp2 podem mediar MDR, embora ambas as seqüências possam ser simultaneamente requeridas para MDR. Cada seqüência pode ser amplificada ao acaso e subsequentemente expressa. O gene Pgp3 aparentemente não tem relação com o fenótipo MDR (Endicott e cols., 1987).

É interessante especular até que ponto a complexidade no fenótipo MDR pode ter origem na expressão diferencial de uma família multigênica que provavelmente se diversificou por mutação e por processamento diferencial das moléculas de RNA mensageiro da glicoproteína P.

Os genes da Pgp estão localizados na região cromossômica 1q26 no hamster (Jongsma e cols., 1987; Teeter e cols., 1986) no cromossomo 5 do camundongo (Martinsson e Levan, 1987) e na região cromossômica 7q21-31 em humanos (Trent e Witkowski, 1987; Fojo e cols., 1987).

A glicoproteína P apresenta similaridade estrutural com componentes bacterianos envolvidos no transporte ativo através da membrana de uma ampla variedade de moléculas, como oligopeptídeos, histidina, maltose, ribose, fosfato, vitamina B12 e hemolisina. Homólogos destas proteínas de transporte ATP-dependentes têm sido registrados para várias espécies, incluindo bactérias, leveduras, protozoários, insetos e mamíferos. Elas constituem uma superfamília de proteínas relacionadas e conservadas ao longo da evolução. Algumas destas são a proteína CTFR humana responsável pela fibrose cística; a proteína relacionada à resistência à cloroquina (CQR) codificada pelo gene pfmdr em *Plasmodium falciparum*; a proteína STE6 da levedura, essencial para a exportação do feromônio de cruzamento fator α e, com um nível mais baixo de homologia, os produtos dos genes de *Drosophila white* e

brown envolvidos no transporte dos precursores do pigmento do olho (Balzi e Goffeau, 1991). Mais recentemente também foi descrita uma bomba de membrana peroxissomal, a qual quando mutante resulta numa disfunção fatal cérebro-hepatorrenal conhecida como síndrome de Zellweger. Além disso, têm sido estudados dois genes ligados associados ao transporte de peptídeos para o retículo endoplasmático relacionados com a apresentação de antígenos pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I; estes genes foram nomeados Tap-1 e Tap-2 onde Tap significa transportador associado ao processamento de antígenos (Gottesman e Pastan, 1993).

Ainda em *Drosophila*, Wu e cols., 1991, descreveram o isolamento e a caracterização de dois homólogos do gene *mdr* de mamíferos. Esses homólogos compartilham 40% de identidade em aminoácidos com o *mdr* humano e murino. Um dos homólogos é o responsável pela resistência do organismo à colchicina.

Expressão da Pgp em tecidos normais

Estudos sobre a distribuição tissular da expressão da Pgp e dos genes MDR têm envolvido vários métodos. Estes incluem sondas de cDNA, anticorpos monoclonais, slot blot, hibridização in situ, imunistoquímica e análise de proteção de RNases. Segundo Musseau, 1994, estes métodos são complementares e não há um consenso sobre qual o melhor processo. Conseqüentemente conclusões baseadas em um único método devem ser encaradas com precaução.

A Pgp é expressa em muitos tecidos normais. Geralmente os níveis mais altos do gene MDR1 têm sido encontrados nos rins (lúmen de túbulos proximais) e no córtex adrenal (zona fasciculata e reticulata), estômago, duodeno, placenta, jejuno e cólon (Fojo e cols., 1987). Outros órgãos e tecidos, tais como o reto, fígado, pulmão e duto pancreático, também apresentam expressão substancial deste gene. Órgãos e tecidos, como a pele, tecido subcutâneo, baço, coração, medula óssea, linfócitos e ovário também foram estudados, apresentando níveis de MDR1 baixos ou indetectáveis.

A variação na expressão do gene MDR1, encontrada em tecidos normais mesmo ao longo do desenvolvimento fetal, sugere que o produto deste gene desempenhe um papel pivotal na fisiologia de vários órgãos e tecidos. Mais recentemente a expressão do MDR1 vem sendo estudada em nível celular. Expressão considerável foi encontrada nas células endoteliais dos capilares de vasos sanguíneos, principalmente nos capilares do sistema nervoso central e testículos (Gottesman e Pastan, 1993). A Pgp nestas células está principalmente localizada na superfície luminal. A expressão de Pgp no cérebro humano sugere um papel na barreira cérebro-sangue (Cordon-

Cardo e cols., 1990). No fígado, a Pgp foi encontrada na superfície biliar dos hepatócitos e nos pequenos ductos biliares. No pâncreas, sobre a superfície luminal das células epiteliais dos pequenos ductos. O cólon e o jejuno mostraram altos níveis de Pgp nas superfícies luminais da mucosa. Cordon-Cardo e cols., 1990, e van der Valk e cols., 1990, registraram a expressão de Pgp em outras células epiteliais especializadas da pele, traquéia, brônquios, próstata, mama, tireóide, pâncreas e nos trofoblastos da placenta.

Como se pode notar, dentro dos órgãos que expressam Pgp em níveis detectáveis, a expressão é bastante localizada. A maioria dos sítios estão sobre as membranas apicais das células, direcionadas para um compartimento excretório. Somente a glândula adrenal apresenta a proteína difusamente distribuída, sugerindo que ela poderia bombear substâncias para o espaço intersticial ao invés de para um sistema secretório com ducto ou para o lúmen do intestino.

A distribuição tissular da Pgp também tem sido estudada em roedores. Nos ratos sabe-se atualmente que a glicoproteína P expressa predominantemente a Pgp3. Sua expressão é mais consistente no fígado e no trato gastrointestinal e baixos níveis foram encontrados nos rins, coração e cérebro. O RNAm de Pgp3 foi indetectável na glândula adrenal e no músculo esquelético. Aparentemente a expressão deste gene é regulada pela localização anatômica com a expressão mais alta em órgãos envolvidos na desintoxicação de drogas (Furuya e cols., 1994). No hamster a mais alta expressão foi encontrada nos testículos, esôfago e útero. Nas glândulas adrenais o nível de Pgp foi baixo no hamster e no camundongo (Baas e Borst, 1988). Nos últimos, em concordância com o já verificado em humanos, o *mdr3* já pode ser encontrado na barreira cérebro-sangue ainda no período embrionário (Qin e Sato, 1995; Jette e cols., 1995). Embora estes estudos não sejam ainda conclusivos, seus resultados sugerem substanciais diferenças entre as espécies na especificidade tissular da Pgp. Variações em tecidos normais de indivíduos da mesma espécie são também encontradas. As causas destas variações não são ainda bem conhecidas, mas uma das possibilidades é o fato dos tecidos serem constituídos de diferentes tipos de células, sendo que a fertilidade mostra que cada uma destas proteínas podem individualmente não ter papel indispensável no início do desenvolvimento ou metabolismo. Camundongos homozigotos para a disrupção de *mdr3* parecem ser hipersensíveis a algumas drogas (Schinkel e cols., 1994).

Expressão da Pgp em tumores

A expressão do MDR1 tem sido detectada em virtualmente todos os tipos de tumores: carcinomas, sarcomas, leucemias e linfomas. Os dados da literatura sobre a detecção de expres-

são de MDR1 em tumores sólidos permitiu a classificação dos mesmos em três grupos: Grupo I - representa os tumores que se desenvolvem a partir dos tecidos que normalmente expressam MDR1 em níveis de intermediários a altos (cólon, rim, fígado, adrenal e pâncreas). Clinicamente estes tumores são todos intrinsecamente resistentes a drogas, ou seja, respondem muito pouco à quimioterapia. Nestes, altos níveis de expressão de MDR1 são freqüentemente encontrados. Grupo II - inclui os tumores que geralmente têm níveis intermediários de expressão de MDR1, mas ocasionalmente podem apresentar altos níveis ou até mesmo não expressar MDR1. Este grupo contém os neuroblastomas, alguns tipos de sarcomas, carcinomas de mama e de acordo com *Nooter e Herweijer*, 1991, as doenças hematológicas. Em geral os tumores do grupo II respondem melhor à quimioterapia do que os do grupo I e até mesmo respostas completas podem ser obtidas. Grupo III - os tumores pertencentes a este grupo apresentam níveis de expressão de MDR1 muito baixos a indetectáveis. Neste grupo são incluídos o câncer de ovário, de cabeça e pescoço, bexiga, esôfago e pulmão. Dignos de nota são os resultados obtidos com tumores de ovário. Embora estudos preliminares tenham indicado a existência de altos níveis de Pgp (*Kartner e cols.*, 1985), estudos posteriores têm demonstrado somente baixa expressão desta proteína em uma grande maioria dos pacientes. Quase todos apresentaram níveis indetectáveis de Pgp (*Bourhis e cols.*, 1989). Nestes tumores a quimioterapia pode ser efetiva, mas novamente a quimiorresistência adquirida não é rara.

Em células hematopoiéticas normais, os níveis de expressão de MDR1 são muito baixos. Entretanto, em quase todos os tipos de leucemias, mielomas múltiplos e linfomas não-Hodgkin, tratados ou não, níveis elevados de MDR1 são encontrados. É possível que os tumores tenham se desenvolvido por excesso de crescimento de células raras, expressando MDR1 presentes nos tecidos originais, ou que a elevada expressão de MDR seja uma consequência da transformação maligna ocorrida nas células tumorais (instabilidade genética).

Interessantemente, *O'Meara e cols.*, 1992, demonstraram que em tumores sólidos infantis, de origem não-epitelial, não foi observada expressão de Pgp e que, portanto, os casos de quimiorresistência não eram mediados por esta glicoproteína. Por outro lado, nas leucemias agudas, a Pgp parece exercer um papel importante no desenvolvimento da quimiorresistência (*Beck e cols.*, 1994).

Regulação da Pgp e resistência a drogas

Do exposto no item anterior se conclui que em tumores desenvolvidos de tecidos que normalmente têm uma expressão substancial de MDR1, tais como de cólon e rim, esta é uma característica inerente das células tumorais. Existem

muitas observações que sugerem que o fenótipo MDR também pode ser adquirido como uma consequência da quimioterapia. Para alguns tipos de tumores, níveis altos de expressão de MDR1 são mais freqüentemente observados em tumores tratados do que em não tratados. Isto tem sido encontrado para leucemias mielóides agudas, neuroblastomas e câncer de mama (*Herweijer e cols.*, 1990; *Goldstein e cols.*, 1990; *Schneider e cols.*, 1989). É muito provável que a aquisição da expressão de MDR1 pelo tumor ocorra no paciente pela seleção de células preexistentes, expressando MDR1. Entretanto, existem cada vez mais evidências de que o promotor de MDR1 possa ser ativado por agentes indutores de estresse químico (*Chin e cols.*, 1990; *Kohno e cols.*, 1989) ou por genes comumente associados com a progressão tumoral, tais como *ras* e o mutante *p53* (*Liu e cols.*, 1994). Em humanos têm sido identificados dois diferentes promotores para o MDR1 com base nos transcritos encontrados em células cultivadas resistentes a múltiplas drogas e alguns tumores resistentes. Um conjunto de transcritos é encontrado em tecidos humanos normais, tais como fígado, rins e adrenais e outro em células selecionadas por drogas. Este segundo conjunto parece ser ativado por seleção e não é normalmente utilizado. Foi verificado que os promotores de roedores são mais responsivos a certos tipos de estresse ambiental e este fenômeno poderia ser explicado pelas grandes diferenças encontradas na sequência de DNA dos promotores de camundongos e hamsters em relação à do promotor MDR1 de humanos (*Gottesman e Pastan*, 1993). Por outro lado, a exemplo do que já havia sido constatado em roedores, observou-se que o estradiol desempenha um papel na regulação transcricional do gene MDR1 humano endógeno. Este resultado foi encontrado em cultura de hepatoblastoma (*Schuetz e cols.*, 1994).

Recentemente foi verificado que os níveis de RNAm no fígado de ratos aumentaram após uma única ingestão de colchicina, alcançaram um pico após 24h e retornaram aos níveis constitutivos após 48h. Interessantemente mudanças no conteúdo relativo de RNAm do gene *mdr* não foram detectadas no rim e na glândula adrenal, sugerindo que a indução in vivo deste gene no fígado é uma resposta tecido-específica (*Vollrath e cols.*, 1994). Por outro lado, a droga verapamil classicamente usada para reverter a resistência a múltiplas drogas (diminui a transcrição do gene MDR1), em altas concentrações aumenta os níveis de RNAm em cerca de duas vezes na linhagem K562 resistente à adriamicina (*Muller e cols.*, 1955). *Fan e cols.*, em 1994, demonstraram in vitro que a expressão relativa de gene *mdr1* é inversamente proporcional à densidade e ao volume de massa tumoral em células de cólon humano e murino, sendo que este fenômeno aparentemente não está relacionado à divisão celular ou à privação de nutrientes.

Glicoproteína P e terapia do câncer

Em relação aos tumores, a questão fundamental é saber se células expressando MDR1 limitam a possibilidade de uma quimioterapia bem-sucedida. Uma das mais fortes evidências de que a expressão de MDR in vivo pode induzir resistência adquirida a drogas é fornecida pelo modelo de camundongos transgênicos (Harris e Hochhauser, 1992). Camundongos transgênicos expressando MDR1 humano nos tecidos hematopoiéticos parecem ser resistentes à leucopenia induzida pelo anticancerígeno daunomicina. Os níveis de expressão de MDR1 em tumores podem ser muito altos em linhagens celulares MDR geradas in vitro. No entanto não se sabe se tais níveis de resistência (três a dez vezes) podem fazer com que um tumor sobreviva aos tratamentos quimioterápicos atualmente empregados. Estudos de quimiossensibilidade com biópsias tumorais de câncer de mama, mieloma e células de câncer renal têm estabelecido correlações inversas entre a expressão de MDR1 e a sensibilidade in vitro a drogas relacionadas com a MDR. Decker e cols., em 1995, estudando pacientes com câncer de mama não encontraram correlação entre a expressão de Pgp e resposta à quimioterapia. Infelizmente, para a maioria das drogas não se conhecem as concentrações in vivo para as quais as células tumorais são expostas.

Tumores inerentemente resistentes a drogas, tais como os de cólon e células renais, têm os mais altos níveis de expressão de MDR1 e tumores com níveis indetectáveis ou baixos de MDR1 são mais responsivos à quimioterapia. Entretanto, esta correlação pode ser enganosa e não prova a contribuição do MDR1 na resistência clínica. O fenótipo MDR é provavelmente um dos vários sistemas de desintoxicação nestas células tumorais (Moscow e Cowan, 1990). Apesar das aparentes exceções, muito provavelmente devidas às limitações técnicas, o aprofundamento dos estudos da expressão da glicoproteína P torna-se importante, na medida em que esta glicoproteína pode provar ser um eficiente marcador diagnóstico da progressão tumoral e da efetividade do tratamento escolhido.

Curiosamente estudos em linhagens celulares sobre alto nível de resistência a múltiplas drogas demonstraram uma sensibilidade colateral aumentada das células resistentes a esteróides, anestésicos aminoterciários locais, detergentes não-iônicos, bloqueadores de canais de cálcio, assim como uma sensibilidade à ruptura por processo mecânico. Uma possível explicação seria a de que grandes quantidades de Pgp na membrana danifiquem a sua estrutura normal, sensibilizando a célula a agentes ativos na membrana. Outra possibilidade é

de que estes agentes sejam encontrados em maior quantidade em células altamente resistentes. Poderia se pensar ainda que o nível de ATP necessário à realização da função da glicoproteína P tornar-se-ia um fator limitante para o reparo dos dados de membrana causados pelas drogas. Esta idéia é corroborada pela evidência de aumentada reposição de ATP na presença de verapamil. Finalmente a Pgp pode indiretamente enfraquecer as defesas celulares contra agentes ativos na membrana, alterando o pH ou as condições iônicas ou ainda expelindo ativamente um composto endógeno necessário para a integridade da membrana normal e/ou para a viabilidade celular. Em termos clínicos, a sensibilidade colateral não é uma abordagem explorável, pois os altos níveis de Pgp requeridos são raramente atingidos nos tumores (Gottesman e Pastan, 1993).

Considerações finais

A despeito da grande quantidade de estudos relacionando Pgp à resistência a drogas, ainda não se conhecem com detalhes as funções fisiológicas desempenhadas por esta proteína em células normais. O fato de ela ser encontrada em tecidos sadios com atividade secretória (fígado, rins, adrenais), ou naqueles continuamente expostos a toxinas ambientais (fígado, rins e cólon), sugere que, no curso da evolução, a célula tenha desenvolvido um meio de proteger a si própria de injúrias ambientais, exportando toxinas antes que elas tenham a chance de exercer seus efeitos deletérios. Um fator crítico no desenvolvimento de tais sistemas talvez tenha sido a necessidade de proteção aos tecidos frente a toxinas de baixo peso molecular encontradas no ambiente, especialmente em alimentos. Muitas destas toxinas encontram-se na forma de alcalóides de plantas e micotoxinas. É interessante lembrar que alguns dos mais ativos agentes anticancerígenos são derivados de plantas, como os alcalóides da vinca e as epipodofilotoxinas. Além disso, os agentes que induzem MDR são produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Desta forma a Pgp pode ter sido mantida ao longo da evolução não para se contrapor aos agentes antineoplásicos utilizados clinicamente, mas para proteger os organismos de toxinas ambientais. Não por acaso, os tecidos mais expostos às toxinas ambientais são os mais ricos em MDR e poderão produzir neoplasmas resistentes a drogas. Paradoxalmente, as tentativas atuais de reversão do fenótipo MDR, embora possam potencialmente facilitar o tratamento de alguns tumores resistentes a múltiplas drogas, podem também causar efeitos tóxicos severos decorrentes de prejuízos na função da glicoproteína P em tecidos normais. Este talvez seja um preço muito alto a ser pago pelo organismo.

Summary

One of the major challenges in cancer chemotherapy is to overcome multidrug resistance (MDR). MDR-expressing cells are cross-resistant to structurally-unrelated naturally derived agents. In this review the authors discuss molecular aspects of the MDR phenomenon, highlighting the main mechanisms responsible for chemotherapy failure. The genetics, structure and function of glycoprotein P are discussed.

Referências bibliográficas

- 1 - ABBASZADEGAN, M. R. et al. 1994. - Analysis of MRP expression in drug resistant cell lines and clinical specimens. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:207, 1994 (abstracts).
- 2 - BAAS, F.; BORST, P. - The tissue dependent expression of hamster P-glycoprotein genes. *Federation Eur Biochem Soc Lett.*, 229(2):329-32, 1988.
- 3 - BALZI, E.; GOFFEAU, A. - Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast. *Biochem Biophys Acta*, 1073:241-52, 1991.
- 4 - BECH-HANSEN, N. T.; TILL, J. E.; LING, V. - Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol.*, 88:23-32, 1976.
- 5 - BECK, J. et al. - PCR gene expression analysis of multidrug resistance associated genes in primary and relapsed state leukemias: comparison of MDR1, MRP, topoisomerase II α , topoisomerase II β and cyclin A mRNA levels. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:337, 1994 (abstracts).
- 6 - BELLAMY, W. T.; DALTON, W. S.; DORR, R. T. - The clinical relevance of multidrug resistance. *Cancer Invest.*, 8(5):547-62, 1990.
- 7 - BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. - Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance, radioautographic and cytogenetics studies. *Cancer Res.*, 30:174-84, 1970.
- 8 - BURGER, H. et al. - Analysis of the expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in hematological malignancies. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:206, 1994, (abstracts).
- 9 - BOURHIS, J. et al. - Correlation of MDR1 gene expression with chemotherapy in neuroblastoma. *J Nat Cancer Inst.*, 81(18):1401-5, 1989.
- 10 - CHIN, K. V. et al. - Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR 1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem.*, 265:221, 1990.
- 11 - CORDON-CARDO, C. et al. - Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.*, 38:1277, 1990.
- 12 - DECKER, D. A. et al. - Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression in breast cancer: clinical correlations. *Ann Clin Lab Sci.*, 25(1):52-9, 1995.
- 13 - ENDICOTT, J. A. et al. - Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug sensitive Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.*, 7:4075-81, 1987.
- 14 - ENDICOTT, J. A.; LING, V. - The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem.*, 58:137-71, 1989.
- 15 - FAIRCHILD, C. R.; GOLDSMITH, M. E.; COWAN, K. H. - Molecular biology of antineoplastic drug resistance. In: *Cosman, J. (ed.) - Molecular genetics in cancer diagnosis*. New York, Elsevier, p.113-141, 1990.
- 16 - FAN, D. et al. - High cell density and large tumor volume down regulate the expression of the MDR1 gene in the CT-26 murine colon carcinoma and the KM12 human colon carcinoma. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:351, 1994 (abstracts).
- 17 - FERGUSON, L. R.; BAGULEY, B. C. - Multidrug resistance and mutagenesis. *Mutation Res.*, 285:79090, 1993.
- 18 - FOJO, A. T. et al. - Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 84:265-9, 1987.
- 19 - FOJO, A. T. - Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 82:7661-5, 1985.
- 20 - FURUYA, K. N. et al. - Isolation of rat pgp3 cDNA: evidence for gender and zonal regulation of expression in the liver. *Biochem Biophys Acta*, 1219:636-44, 1994.
- 21 - GOLDIE, J. H. - Drug resistance. In: *Perry, M.C. (ed.) - The chemotherapy sourcebook*. Baltimore, Williams & Wilkins, p.54-67, 1992.
- 22 - GOLDIE, J. H.; GOLDMAN, A. J. - Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treat Rep.*, 67:923-31, 1983.
- 23 - GOLDSTEIN, L. J. et al. - Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastomas. *J Clin Oncol.*, 8(1):128-36, 1990.
- 24 - GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. - Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.*, 62:385-427, 1993.
- 25 - GROS, P.; CROOP, J.; HOUSMAN, D. - Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell.*, 47:371-80, 1986.
- 26 - HERWEIJER, H. et al. - Expression of MDR1 and MDR3 multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and association with stimulation of drug accumulation by cyclosporine. *J Nat Cancer Inst.*, 82:1133, 1990.
- 27 - HARRIS, A. L.; HOCHHAUSER, D. - Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol.*, 31(2):205-13, 1992.
- 28 - JETTE, L. et al. - Isoform 1 (mdr3) is the major form of glycoprotein expressed in mouse brain capillaries - evidence for cross-reactivity of antibody C219 with an unrelated protein. *Biochem J.*, 305: 761-6, 1995.
- 29 - JONGSMA, A. P. M. et al. - Chromosomal localization of three genes coamplified in the multidrug-resistant CHRC5 Chinese hamster ovary cell line. *Cancer Res.*, 47:2875-8, 1987.
- 30 - JULIANO, R. L.; LING, V. - A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants. *Biochem Biophys Acta*, 455:152-62, 1976.
- 31 - KARTNER, N. et al. - Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 316:8220-3, 1985.
- 32 - KESSEL, D.; BOTTERIL, V.; WODINSKY, I. - Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res.*, 28:938-41, 1968.
- 33 - KESSEL, D. et al. - Uptake as a determinant of methotrexate response in mouse leukemia. *Science*, 150:752-4, 1965.
- 34 - KOHNO, K. et al. - The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR 1) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Comm.*, 165:1415, 1989.
- 35 - KUIPER, C. M. et al. - Functional detection of MRP overexpressing tumor cell lines using flow cytometry and laser scan microscopy. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:348, 1994 (abstracts).
- 36 - LINCKE, C. R. et al. - Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus. *J Biol Chem.*, 266(8):5303-10, 1991.
- 37 - LIU, B. et al. - Transactivation of the human multidrug resistance (MDR1) gene promoter by p53 mutants. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:345, 1994 (abstracts).
- 38 - MARTINSSON, T.; LEVAN, G. - Localization of the multidrug resistance-associated 170Kda P-glycoprotein gene to mouse chromosome 5 and to homogeneously staining regions in multidrug-resistant mouse cells by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.*, 45:99-101, 1987.
- 39 - MEYERS, M. B. et al. - Gene amplification-associated cytogenetic aberrations and protein changes in vincristine-resistant Chinese hamster, mouse and human cells. *J Cell Biol.*, 100:588-97, 1985.
- 40 - MOSCOW, J. A.; COWAN, K. H. - Multidrug resistance in cancer chemotherapy and biological response modifiers. Amsterdam, Elsevier Science, p.97, 1990.
- 41 - MULLER, C. et al. - Evidence for transcriptional control of human mdr1 gene expression by verapamil in multidrug-resistant leukemic cells. *Mol Pharmacol.*, 47(1):51-6, 1995.
- 42 - MUSSEAU, M. - Diagnostic tools for MDR: immunohistochemistry versus molecular biology. *Bull Cancer*, 81(Suppl 2):S84-S85, 1994.
- 43 - NOOTER, K.; HERWEIJER, H. - Multidrug resistance (MDR) genes in human cancer. *Brit J Cancer*, 63:663-9, 1991.
- 44 - O'MEARA, A. et al. - Reactivity of P-glycoprotein monoclonal antibodies in childhood cancers. *Oncology*, 49: 203-8, 1992.
- 45 - QIN, Y.; SATO, T. N. - Mouse multidrug resistance 1a/3 gene is the earliest known endothelial cell differentiation marker during blood-brain barrier development. *Dev Dyn.*, 202:172-80, 1995.
- 46 - REED, E. - Alkylating agents and platinum: is clinical resistance simply a tumor cell phenomenon? *Curr Opin Oncol.*, 3:1055-9, 1991.
- 47 - RIORDAN, J. R. et al. - Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 316:817-9, 1985.
- 48 - RONINSON, I. B. et al. - Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in Chinese hamster cells. *Nature*, 309:626-8, 1984.
- 49 - SCHINKEL, A. H. et al. - Generation of mice with a homozygous disruption of the mdr1a or mdr1b P-glycoprotein genes. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:344, 1994 (abstracts).
- 50 - SCHNEIDER, J. et al. - P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. *Brit J Cancer.*, 50:815-8, 1989.
- 51 - SCHUETZ, J. D. et al. - Estrogenic induction of human mdr in the human hepatoblastoma HepG2. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 35:555, 1994 (abstracts).
- 52 - SMIT, J. M. et al. - Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest.*, 71:638-49, 1994.
- 53 - TEETER, L. D. et al. - DNA amplification in multidrug, cross-resistant Chinese hamster ovary cells: molecular characterization and cytogenetic localization of the amplified DNA. *J Cell Biol.*, 103:1159-66, 1986.
- 54 - TRENT, J. M.; WITKOWSKI, C. M. - Classification of the chromosomal assignment of the human P-glycoprotein/MDR1 gene: possible coincidence with the cystic fibrosis and C-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet.*, 26:187-90, 1987.
- 55 - Van der BLIEK, A. M. et al. - A 22-Kd protein (Sorcin/V19) encoded by an amplified gene in multidrug-resistant cells, is homologous to the calcium binding light chain of calpain. *EMBO J.*, 5:3201-8, 1986.
- 56 - Van der VALK, P. et al. - Distribution of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. *Am Oncol.*, 1:56, 1990.
- 57 - VOLLATH, V. et al. - Effect of colchicine and heat shock on multidrug resistance gene and P-glycoprotein expression in rat liver. *J Hepatol.*, 21:754-63, 1994.
- 58 - WU, C. T. et al. - Isolation and characterization of Drosophila multidrug resistance gene and homologs. *Mol Cell Biol.*, 11(8):3940-8, 1991.