

Resistência a múltiplas drogas: um problema da clínica oncológica com solução na pesquisa básica

LUDMILA S. MEDINA DA CUNHA¹, FERNANDO MEDINA DA CUNHA¹, MARY DA SILVA THEREZA¹, REGINA A. MARTINHO¹, ANDRÉ AUGUSTO Jr. G. MORAES¹, RICARDO LIMA ZOLINER²

Trabalho realizado pelas disciplinas de Oncologia Clínica e Imunologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da UNICAMP/SP

Resumo

A resistência que as células neoplásicas apresentam aos agentes quimioterápicos sempre é um grande problema para o oncologista clínico. A descoberta da glicoproteína (170 Pgp) responsável pela resistência a múltiplas drogas (MDR) abriu novas perspectivas de se superar este difícil tipo de resistência. Neste trabalho, apresentamos uma retrospectiva do trabalho de pesquisa realizado até a definição do modelo que hoje rege os trabalhos clínicos no emprego de agentes reversores da MDR.

Unitermos: quimioterapia - resistência a múltiplas drogas

Introdução

A capacidade das células neoplásicas desenvolverem resistência aos quimioterápicos é a razão do insucesso da maioria dos tratamentos antineoplásicos desde o início de seu emprego no combate ao câncer.

A pesquisa contínua de novas drogas cada vez mais potentes não tem melhorado os índices de cura para a grande maioria dos tumores, ficando as melhores estatísticas restritas a tumores de testículo, leucemias linfoblásticas agudas da infância e linfomas difusos. Nas neoplasias mais freqüentes da prática clínica consegue-se uma resposta na indução do tratamento, a qual mais cedo ou mais tarde é seguida de recidiva e progressão do tumor a despeito da introdução de outras drogas.

O advento da utilização combinada de drogas, esquematizando a dose e a freqüência da administração, foi a solução clínica encontrada para tentar reduzir a possibilidade do surgimento de populações celulares resistentes. Contudo, ainda não se dispõe de uma abordagem terapêutica dirigida especificamente para os mecanismos de resistência celular. O

estudo de cada um destes mecanismos torna-se prioridade no direcionamento para a obtenção de melhores índices de cura.

Podemos dividir o fenômeno de resistência basicamente em dois tipos: primeiro, a resistência *de novo*, aquela que já se observa nas células tumorais quando passam pelo processo de malignização. Em outras palavras, é a resistência intrínseca encontrada, por exemplo, em tumores de cólon, adenocarcinoma de pulmão e hipernefomas. O segundo tipo é a resistência adquirida, aquela que ocorre após a exposição das células e agentes citotóxicos. Vários mecanismos celulares são responsáveis pela formação de clones residuais de células resistentes, que são usualmente refratárias a uma nova combinação de drogas antineoplásicas.

A solução está na pesquisa oncológica básica. O estudo das linhagens celulares tumorais e seus mecanismos de resistência propiciarão o encontro da abordagem terapêutica que permita superá-los. Foi no estudo da resistência adquirida que Biedler e Rihm [1], em 1970, verificaram que linhagens celulares de *hamster*, selecionadas por altos níveis de resistência à actinomicina D, apresentavam resistência

¹Disciplina de Oncologia Clínica; ²Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia. Departamento de Clínicas Médicas - UNICAMP. Endereço do autor para correspondência: Depto. de Clínica Médica - Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP). Cx Postal 1170. Campinas, SP - CEP 13100.

cruzada a algumas drogas estruturalmente não relacionadas, como a vimblastina, vincristina e mitomicina C. Surgia com esta observação um dos mais intrigantes problemas de resistência. Como células expostas a uma só droga poderiam desenvolver resistência a outras com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação? Em vários centros de pesquisas, linhagens celulares de tumores, inclusive humanos, foram induzidas à resistência por exposição contínua a crescentes concentrações de quimioterápicos, como a doxorrubicina, confirmando-se os resultados anteriores. Este padrão de resistência ficou conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) ou resistência pleotrópica, que no padrão clássico inclui diversas drogas cujo fator comum é o de se tratarem de produtos naturais (Tabela 1).

Tabela 1. Drogas envolvidas na MDR.

Antibióticos:	Mitramicina Actinomicina-D Puromicina Mitomicina-C
Antraciclinas:	Doxorrubicina Daunorrubicina Mitoxantrona
Antimitóticos:	Vincristina Vinblastina Colchicina
Epipodofilotoxinas:	Etoposide Teneposide
Outros:	Emetina Gramicidina D Taxol

Observou-se que a resistência entre as drogas envolvidas no fenômeno poderia apresentar um padrão quantitativo diverso, ou seja, uma linhagem celular seria mais resistente a uma droga que a outra, mas a propriedade de resistência permanecia qualitativamente inalterada, sempre envolvendo as mesmas drogas, independentemente de qual delas tivesse sido usada como agente indutor da resistência (colchicina, alcalóides da vinca, antraciclinas ou epipodofilotoxinas).

Ling e cols. [2, 3] foram os primeiros a observar que a MDR estava associada a um decréscimo no acúmulo intracelular da droga. Seus estudos também permitiram identificar a presença de uma glicoproteína associada a membrana plasmática, de aproximadamente 170.000 daltons (170 Pgp, 170 P-glicoproteína) nas células resistentes e que estava ausente nas linhagens celulares originais e sensíveis.

Formaram-se, então, duas linhas de pesquisas concomitantes: a do próprio Ling [4, 5], demonstrando que o conteúdo da 170 P-glicoproteína nas células poderia estar diretamente relacionado, tanto com o grau de redução de acúmulo intracelular da droga, como também com o grau de resistência a esta mesma droga pelas células. Ao conhecimento de que a entrada na célula, dos quimioterápicos em questão, se faz por difusão, somou-se a demonstração de que os inibidores metabólicos ou a supressão da glicose do meio de cultura aumenta o acúmulo intracelular da droga [6]. Estas informações, associadas ao fato de que as células resistentes mantêm uma menor concentração de droga devido a uma maior excreção, fazem supor a existência de um mecanismo de efluxo de toxinas dependente de energia. A presença de 170 Pgp na membrana das células resistentes, sua associação com a bomba de efluxo e com a resistência a múltiplas drogas têm sido confirmadas na segunda linha de pesquisa, direcionada para a biologia molecular. Nesta área, verificou-se a presença freqüente de cromossomos *double minute*, indicativos de ampliações gênicas nas células resistentes [7, 8]. Inúmeras técnicas genéticas foram empregadas [9] para isolar seqüências que fossem amplificadas nas células resistentes e estivessem ausentes nas células sensíveis. Identificaram-se segmentos que codificam a 170 P-glicoproteína em células tumorais de hamster, camundongos e humanos. Tais segmentos são chamados genes *mdr* ou *pgp* [10, 11]. Em linhagens de tumor humano isolaram-se duas isoformas da P-glicoproteína, *mdr1* e *mdr3*, porém apenas a primeira mostrou associação com a MDR, sendo a função da isoforma *mdr3* ainda desconhecida. Tentativas de transfecção destes genes para células sensíveis resultaram em linhagens com fenótipo MDR clássico [12, 13], apresentando redução do acúmulo intracelular de droga, resistência cruzada com outras drogas envolvidas no fenômeno e detecção da 170 Pgp na membrana celular.

A 170 Pgp é composta de duas metades similares com 12 regiões hidrofóbicas ao longo da molécula e que correspondem aos pontos onde ela cruza a membrana plasmática. Nas extremidades da molécula existem segmentos que se ligam à molécula de ATP, de onde provêm a energia para o efluxo das drogas, e por fim uma área de glicolisação que se localiza em região externa à célula [14]. O mecanismo exato de transporte da 170 P-glicoproteína e a função que desempenha nas células na ausência de citotóxicos ainda são desconhecidos. Níveis elevados do gene *mdr1* têm sido detectados em tecidos humanos normais como os da glândula supra-renal, rim, pulmão, fígado, jejuno, cólon e reto, onde se localiza no pólo excretor das células. Este achado tem sido a base da hipótese formulada pelos pesquisadores de que a

170 Pgp esteja associada ao processo de desintoxicação do organismo, explicando-se sua atuação apenas sobre drogas que se originam de produtos naturais. É interessante notar que a P-glicoproteína se faz presente em tecidos cujos tumores apresentam resistência intrínseca à quimioterapia [15, 16].

Começam a surgir na literatura os primeiros dados correlacionando a presença do gene *mdr1* com a resistência de tumores e o aumento de expressão de *mdr1* nas recidivas [17]. Este se encontra em níveis elevados em tumores não tratados, como carcinoma de cólon, hipernefoma, hepatoma, câncer adrenocortical, feocromocitoma, tumores de pâncreas, leucemias mielóides crônicas em crise blástica, neuroblastoma; e em recidivas pós-quimioterapia de linfomas não-Hodgkin, neuroblastomas, neoplasia de mama e leucemias.

O primeiro estudo retrospectivo da possível importância clínica da MDR foi em rhabdomyosarcomas, mostrando uma grande diferença estatística na evolução e sobrevida entre os grupos de pacientes positivos e negativos para a 170 Pgp [18]. Como os dados analisados até a presente data não incluem grandes séries, estudos prospectivos com avaliação da expressão MDR antes do tratamento e na recidiva estão em andamento, quando então se terá uma avaliação mais precisa da importância prognóstica do gene *mdr1*. Anticorpos monoclonais dirigidos contra a 170 P-glicoproteína foram produzidos, existindo mais três utilizados em pesquisa: MRK16 [19], JSB1 [20] e o C219 [21]. Com estes anticorpos consegue-se detectar *in vitro* a presença de células com expressão da 170 Pgp. Contudo, o uso desta abordagem *in vivo* ou como tratamento ainda não está disponível, mas esta é uma possibilidade já em fase de estudos pré-clínicos.

As investigações correm ainda em outra direção: É possível reverter o fenômeno de resistência a múltiplas drogas tornando sensível ao tratamento um tumor resistente? Inúmeras substâncias têm mostrado moduladores da MDR. O grupo mais bem estudado é o dos bloqueadores de canais de cálcio, como verapamil e nifedipina. A lista (Tabela 2) dos reversores de MDR incluem também drogas não relacionadas com mecanismo de regulação de cálcio [22, 23, 24, 25]. Apesar do mecanismo de ação não estar definido, alguns trabalhos [26, 27] mostram uma ação direta destas substâncias sobre a 170 P-glicoproteína. Presume-se que haja uma competição pelo mesmo sítio de ligação entre a droga citotóxica e os moduladores na molécula da 170 Pgp. Por outro lado, estudos clínicos usando doxorrubicina e verapamil no tratamento de tumores de ovário refratários não mostraram melhora da resposta [23, 28]. O maior problema apresenta-se nas altas doses de verapamil necessárias para potencializar os efeitos da doxorrubicina, resul-

tando em inaceitável toxicidade cardíaca devido ao bloqueador de cálcio. Apesar destes primeiros resultados desencorajadores, as pesquisas continuam buscando o agente reversor ideal para o uso clínico [29, 30, 31].

Tabela 2. Agentes reversores.

Bloqueadores de cálcio:	
Verapamil	Nifedipina*
Desmetoxiverapamil	Nicardipina*
Diltiazem*	Niludipina*
Nitrendipina	Bepidil*
Caroverina	Nimodipina*
Inibidores de calmodulina:	
Trifluoperazina	
Clomipramina	
Premylamina	
NO233	
Análogos não-citotóxicos:	
N-acetildaunorrubicina*	
Vindolina	
Bloqueador de microfilamentos:	
Citochalasina	
Detergentes:	
Deoxicholate	
Tween 80	
Antibióticos:	
Anfotericina B	
Filipina	
Imunossupressores:	
Ciclosporina A*	
Antiarrítmicos:	
Procainamida	
Quinidina	
Cloroquina	
Lidocaína	
Propranolol	
Difenil hidantóina	
Substâncias lisossomotrópicas:	
Triton WR 1339	
Monodansicadaverina	
Metilamina	

*testados *in vivo*

Outros mecanismos além da 170 P-glicoproteína parecem estar envolvidos na MDR. Em algumas linhagens celulares [32, 33] encontram-se o padrão de resistência cruzada e a redução do acúmulo intracelular da droga, mas sem ser possível a detecção de

um aumento na expressão da 170 Pgp. Outros padrões de resistência múltipla têm sido descritos [34, 35], chamados de resistência atípica a múltiplas drogas. Nesta situação há resistência cruzada a etoposíde e antraciclinas, mas estas células se mantêm sensíveis aos alcalóides da vinca. Não há expressão da 170 Pgp e não há alteração no acúmulo intracelular da droga. Todos estes dados sugerem outro mecanismo intracelular que não o de transporte como responsável pela resistência na MDR atípica. Há, também, dados sobre alterações no sistema enzimático de desintoxicação celular com decréscimo de Aril hidrocarbono hidroxilase (AHH) e aumento da atividade de glutathione S Transferase (GSH), ambos os fenômenos resultando em maior inativação das drogas [36]. Atualmente ainda não se estabeleceu a importância destas alterações enzimáticas detectadas sobre a expressão do fenótipo MDR. Provavelmente o fenômeno de resistência múltipla e o resultado da interação de diferentes mecanismos de defesa celular, incluindo tanto a amplificação de genes como a alteração do sistema enzimático e mesmo novos processos ainda não identificados.

Apesar das dúvidas existentes, o modelo da 170 Pgp é o mais consistente que o laboratório forneceu à clínica até o momento sobre o fenótipo MDR. Portanto, torna-se urgente o melhor conhecimento deste fenômeno, de forma que seja possível a melhor forma de detecção, prevenção e reversão do problema, permitindo contorná-lo com segurança na prática clínica diária. Como resultado imediato do sucesso em ultrapassar a MDR teríamos uma grande percentagem dos pacientes já resistentes ao tratamento, com chances de resposta a uma nova abordagem terapêutica.

Summary

One of the major problems in clinical oncology is the drug resistance phenomenon. Frequently, tumor cells are able to overpass the damage caused by cytostatic agents. The discovery of 170 P-glycoprotein (170 Pgp) as responsible for multidrug resistance (MDR) was an important research step on this field. Here, we present a retrospective on the definition of the 170 Pgp model.

Key words: chemotherapy; multidrug resistance

Referências bibliográficas

1. BIEDLER JL, RIEHM H. Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cell in vitro: Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970; 30: 1174-1184.
2. BECH-HANSON NT, TILL JE, LING V. Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant HO cells: cross resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol* 1976; 88: 23-32.
3. JULIANO JL, LING VA. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta* 1976; 455: 152-162.
4. KARTNER N, RIORDAN JR, LING V. Cell surface Pglycoprotein is associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983; 221: 1285-1288.
5. LING V, THOMPSON LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colicine. *J Cell Physiol* 1973; 83: 103-116.
6. BECK WT. The cell biology of multiple drug resistance. *Pharmacol* 1987; 36: 2879-2887.
7. BASKIN F, ROSEMBERG RN, DEV V. Correlation of double-minute chromosomes with unstable multidrug cross-resistance in uptake mutants of neuroblastoma cells. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1981; 78: 3654-3658.
8. GRUND SH, PATIL SR, SHAH HO, PAUW PG, STADLER JK. Correlations of unstable multidrug cross resistance in chinese hamster ovary cells with a homogenously staining region on chromosome. 1. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 1634-1647.
9. RONINSON IB, ABLESON HT, HOUSMAN DE, HOWELL N, VARSHAVSKU A. Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in chinese hamster cells. *Nature* 1984; 309: 636-628.
10. SCOTTO KW, BIEDLER JL, MELERA PW. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science* 1986; 232: 751.
11. CROOP JM, GUILD BC, GROS P, HOUSMAN DE. Genetics of multidrug resistance: relationship of a cloned gene to the complete multidrug resistance phenotype. *Cancer Research* 1987; 47: 5982-5988.
12. UEDA K, CARDARELLI C, GOTTESMANN MM, PASTAN I. Expression of a full length cDNA for human "MDRI" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1987; 84: 3004.
13. GUILD BC, MULLIGAN RC, GROS P, HOUSMAN DE. Retroviral transfer of a murine cDNA for multidrug resistance confers pleiotropic drug resistance to cells without prior drug selection. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1989; 85: 1595-1599.
14. MARX J. Drug resistance of cancer cells probe. *Science* 1986; 234: 818.
15. FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Expression of multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1987; 84: 265-269.
16. SUGAWARA I, KATACKA I, MORISHITA Y, HAMADA H, TSURUO T, ITOYAMA S, MORI S. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug resistant gene as revealed by a monoclonal antibody MRK16. *Cancer Res* 1988; 48: 1926-1929.
17. GOLDSTEIN LJ, GALSKI H, FOJO A et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 116-124.
18. CHAN HSL, THORNER PS, HADDAD G, LING V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 1990; 8: 689-704.
19. HAMADA H, TSURUO T. Functional role for the 170-180 kDa

- glycoprotein specific to drug resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83: 7785-7789.
20. SCHEPER RJ, BUETE JWM, BROXTERMAN HJ, PINEDO H. Monoclonal antibody JSB1 detects a highly conserved epitope on the Pgp associated to multidrug resistance. *Int J Cancer* 1988; 42: 389-394.
 21. KATNER N, PORELLE DE, BRADLEY G, LING V. Detection of P-glycoprotein in resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 1985; 316: 820-824.
 22. TSURUO T, LIDA H, NOJIRI M, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y. Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res* 1983; 43: 2905-2910.
 23. ROGAN AM, HAMILTON TC, YOUNG RC. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 1984; 224: 994-996.
 24. TSURUO T, LIDA H, KITATANI Y, YOKOTA K, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y. Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug resistant tumor cells. *Cancer Res* 1984; 44: 4303-4307.
 25. SLATER LM, SWEET P, STUPECKY M, WETZEL MW, GUPTA S. Cyclosporin A corrects daunorubicin resistance in Ehrlich ascited carcinoma. *Br J Cancer* 1986; 54: 235-238.
 26. CORWELL MM, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1987; 262: 2166-2170.
 27. SAFA AR, GLOVER CJ, SEWELL JL, MEYERS MB, BIEDLER JL, FELSTED RL. Identification of the multidrug resistance related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 1987; 262: 7884-7888.
 28. OZOLS RF, CUNNION RE, KLECKER RW. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 1987; 5: 641-647.
 29. SHINIDA H, INABA M, TSURUO T. In vivo circumvention of vincristine resistance in mice with P388 leukemia using a novel compound: AHC-52. *Cancer Res* 1989; 49: 1722-1726.
 30. TWENTYMAN PR. Modification of cytotoxic drug resistance by immunosuppressive cyclosporins. *Br J Cancer* 1988; 57: 264-268.
 31. KRAMER RA, ZAKHER J, KIM G. Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance. *Science* 1988; 241: 694-697.
 32. MCGRATH T, CEUTER MS. Adriamycin resistance in HL-60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Com* 1987; 145: 1171-1176.
 33. MIRISKI SEL, GERLACH JH, COLE SPC. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer line selected in adriamycin. *Cancer Res* 1987; 47: 2594-2598.
 34. DANKS MK, YALOWISH JC, BECK WT. Atypical multiple drug resistance in a human leukemic cell line selected for resistance to teniposide (VM 26). *Cancer Res* 1987; 47: 1297-1301.
 35. BECK WT, LIRTAİN MC, DANKS MK. Pharmacological molecular and cytogenetic analysis of atypical multidrug resistant human leukemia cells. *Cancer Res* 1987; 47: 5455-5460.
 36. COWAN KH, BATIST G, TULPULE A, SENHA BK, MEYERS CE. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83: 9328-9332.