

R

ESISTENCIA A

MÚLTIPLES DROGAS

UN MECANISMO DE EVASIÓN CELULAR ANTE LOS TRATAMIENTOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

Dulce María Delgadillo

Dulce María Delgadillo (ciudad de México, 1965) es licenciada en biología por la UNAM, maestra en ciencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del IPN y doctora en ciencias por el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) del IPN.

¿Alguna vez se ha preguntado por qué, en ocasiones, una persona afectada por cierta enfermedad infecciosa no responde al tratamiento aplicado? ¿Por qué a veces se necesita un conjunto de medicamentos para atacar un padecimiento causado por un solo tipo de organismo patógeno? Uno de los mayores problemas al que científicos y médicos se han enfrentado en su lucha para la prevención, el control y la erradicación de enfermedades causadas por parásitos, así como varios tipos de cáncer, es la resistencia que las células afectadas presentan a las diversas drogas o fármacos usados en el tratamiento de estas afecciones.

El origen de este problema se desconoce, pero puede deberse, en parte, a la interrupción de los tratamientos debido a los efectos secundarios que los medicamentos causan en los pacientes. A pesar de numerosas investigaciones sobre este fenómeno se conoce muy poco acerca de las alteraciones bioquímicas o moleculares por las cuales células y parásitos se convierten en resistentes o refractarios a fármacos. Sin embargo, se han podido analizar algunos de los mecanismos involucrados en la resistencia a múltiples drogas o MDR (*multidrug resistance*) al desarrollarse técnicas de biología molecular como la generación de anticuerpos monoclonales



dirigidos contra las proteínas involucradas en el proceso, el aislamiento de ciertos genes que codifican para dichas proteínas y la transfección o introducción de estos genes en células o parásitos sensibles a drogas y a los que se les confiere el fenotipo de resistencia a ellas.

La resistencia a múltiples fármacos se describió por primera vez en células cancerosas y luego en virus, bacterias, hongos, plantas y animales. La MDR se ha definido como la capacidad que tienen las células para desarrollar resistencia a una droga que se usa como agente selectivo y, además, presentar resistencia cruzada a fármacos no relacionados bioquímica ni estructuralmente con la droga que se usó en la selección. Otra característica de este fenotipo es que puede ser revertido mediante la adición al cultivo celular del agente químico verapamil, un bloqueador de canales de calcio cuyo mecanismo de acción en el fenómeno no ha sido esclarecido.

Los fármacos que con más frecuencia están involucrados en el fenotipo MDR son del tipo de los alcaloides o de los antibióticos. La acción de estas sustancias está dirigida a bloquear la síntesis de macromoléculas como el DNA (imidazoles), el RNA (actinomicina D y melfafan) y las pro-

teínas (puromicina y emetina). Fármacos como la colchicina y los vinca alcaloides interfieren en el ensamble de proteínas como la tubulina, cuya función es formar y mantener el soporte celular o citoesqueleto. Otras sustancias (como las antraciclinas y podofilinas) bloquean la activación de la enzima topoisomerasa II que tiene como función “desenrollar” la doble hélice de DNA para permitir su replicación.

¿Cuál es el mecanismo que las células resistentes emplean para evadir la acción de los medicamentos? La resistencia a múltiples fármacos se debe a un decremento en la acumulación intracelular de éstos mediada por un incremento en el eflujo o extrusión de los mismos. ¿Cómo y quién realiza este eflujo? En células tumorales frecuentemente se ha observado la expresión exacerbada o sobreexpresión de una fosfoglicoproteína de membrana de aproximadamente 170 kilodaltones, denominada P-glicoproteína o Pgp.

En el humano, la Pgp es codificada por el gen MDR1 y se ha descrito, además, la presencia de otros dos genes: el MDR2 y el MDR3. Estos genes se expresan de manera normal en diferentes tejidos y órganos como el riñón, hígado, intestino, páncreas, colon, células endoteliales de cerebro, testículos y

en células de la corteza adrenal. Sin embargo, en células cancerosas los niveles de expresión de los genes MDR se incrementan y se sugiere que esta expresión puede ser modificada en diferentes tipos celulares por una amplia variedad de estímulos como la hapatectomía parcial, el tratamiento con xenobióticos, el choque térmico, el daño al DNA, la presencia de agentes quimioterapéuticos y algunos factores de crecimiento, entre otros. Dentro de los mecanismos involucrados en la sobreexpresión de los genes MDR se ha visto una amplificación de ellos (es decir, se incrementa el número de copias del gen) y, también, que su regulación está dada principalmente a nivel de la síntesis de RNA, proceso conocido como transcripción.

Pero, ¿cómo es una P-glicoproteína? Las Pgp presentan características topológicas que les permiten llevar a cabo la función de bomba expulsora de fármacos del interior al exterior celular. Estas moléculas pertenecen a la familia de proteínas ABC (ATP binding cassette), cuya característica es que en su secuencia de aminoácidos tienen segmentos que reconocen y se unen a una molécula de trifosfato de adenosina (ATP). Las Pgp están constituidas por dos mitades homólogas con seis dominios transmembranales cada una. Los 12 segmentos que atraviesan la membrana forman un poro a través del cual pasan las drogas. En la cara de la proteína que mira hacia el citoplasma, las Pgp tienen dos sitios de unión a ATP, una molécula que al ser rota o hidrolizada provee la energía necesaria para que estas proteínas actúen como bombas capaces de expulsar las drogas.

En el curso de las investigaciones realizadas el alineamiento y la comparación de las secuencias de DNA de las dos mitades homólogas de las Pgp han mostrado que existe un gran parecido entre ellas, lo que sugiere que podrían provenir de la duplicación de un ancestro común. Luego de ser sintetizadas las Pgp se modifican cuando se les unen pequeñas cadenas de azúcares u oligosacáridos. Este mecanismo, llamado glicosilación, al parecer no participa en la función de transporte de la proteína, y sin embargo es una de las características que la definen.

Otra modificación de las Pgp es la fosforilación; es decir, la adición de grupos fosfato a aminoácidos como la serina y la treonina. La fosforilación de las Pgp, al parecer, tiene un efecto directo sobre su actividad, pues dentro de la secuencia primaria de la proteína existen varios sitios que son blancos para las cinasas (moléculas que llevan a cabo la función

de unir los grupos fosfato a la proteína). Además, el tipo de actividad biológica que las Pgp realizan sugiere, con una probabilidad muy alta, que esta molécula está bajo el control de algún sistema de regulación fino como sería la fosforilación reversible.

El papel fisiológico de las Pgp en el eflujo de drogas ha sido postulado con base en la expresión de estas proteínas en la membrana apical del epitelio intestinal, células de hígado y túbulos renales, en donde pueden realizar procesos de detoxificación. Sin embargo, las Pgp se expresan también en glándulas adrenales, en células hematopoyéticas, en células del sistema inmunológico—como las llamadas asesinas naturales (NK)—, en células dendríticas presentadoras de antígeno y en linfocitos T y B. Además, se ha encontrado expresión de Pgp en embriones y en placenta humana.

La expresión de las Pgp en epitelios gastrointestinales o del sistema urinario está en concordancia con su papel de remoción de drogas o sustancias tóxicas, mientras que su expresión en células adrenales y hematopoyéticas ha llevado a proponer funciones adicionales para estas proteínas. Así, se ha encontrado que las Pgp también participan en el transporte de citocinas, la translocación de lípidos, en apoptosis, en diferenciación celular y en la regulación de canales de cloro activados por cambios en el volumen celular. El hecho de estar involucradas en una amplia gama de actividades fisiológicas apoya fuertemente la teoría de que la fosforilación puede determinar el papel biológico de las Pgp en diferentes tipos celulares y en respuesta al estímulo adecuado.

Esta breve exposición de las características de la Pgp y del fenómeno MDR permite observar que este es un mecanismo complejo. La resistencia a drogas en células que son perjudiciales para el organismo, como en el caso del cáncer o de infecciones con microorganismos patógenos, ha constituido un punto clave a nivel de los tratamientos clínicos a los que se somete a los pacientes afectados por este tipo de padecimientos. Algunos ejemplos de la manifestación del fenotipo MDR se pueden ver en las infecciones causadas por parásitos protozoarios.

Los parásitos protozoarios son agentes causales de una amplia gama de enfermedades devastadoras y muchas veces fatales en los seres humanos. Entre éstas se encuentran la malaria, causada por *Plasmodium spp*; la enfermedad del sueño, por *Trypanosoma brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*; la



enfermedad de Chagas, producida por *T. Cruzi*; la giardiasis, por *Giardia duodenalis*; la disentería amibiana, producida por *Entamoeba histolytica*; la leishmaniasis, por *Leishmania spp*; y la tricomoniasis, por *Trichomonas vaginalis*.

Para las enfermedades parasitarias no se han logrado desarrollar vacunas, por lo que su control ha sido sólo con tratamientos quimioterapéuticos. Sin embargo, como se mencionó, el tratamiento de estas afecciones se ha topado con la manifestación del fenotipo MDR en los parásitos. En algunos de estos organismos los genes que codifican para las Pgp han sido aislados y caracterizados. El número de genes y/o sus niveles de expresión han sido implicados en la resistencia de los parásitos a diferentes fármacos. Pero, la mayoría de las Pgp estudiadas en estos protozoarios no han sido analizadas funcionalmente y su secuencia de aminoácidos sólo ha sido predicha con base en la secuencia de bases nucleotídicas de los genes identificados.

El alineamiento de estas secuencias con los genes MDR de mamíferos ha mostrado una alta homología con ellos, lo que sugiere que las proteínas que codifican podrían tener una actividad similar a la observada en los organismos de referencia.

Resistencia a fármacos en *P. falciparum*

La evolución y dispersión de trofozoítos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (CQ) ha limitado el uso de este fármaco en muchas regiones donde la malaria es endémica. En algunas cepas de *P. falciparum* la resistencia a CQ ha sido atribuida a una disminución en la acumulación de la droga o a un elevado eflujo de la misma. Esto es, que la droga no entre al citoplasma del parásito o que, una vez dentro, sea rápidamente expulsada de él. De *Plasmodium* se han aislado dos genes MDR: el gen *pfmdr1* y el gen *pfmdr2*. El primero presenta las características típicas de los miembros de la familia Pgp y ha sido implicado en la resistencia del parásito a drogas como la CQ y la mefloquina. El segundo, el gen *pfmdr2*, presenta una topología atípica que se asemeja más al gen de resistencia a cadmio presentado por la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

Resistencia a fármacos en *Leishmania*

Las diferentes especies de *Leishmania* son la causa de un amplio espectro de enfermedades que van desde una infección cutánea limitada a ciertas áreas de la piel hasta una infección visceral virulenta y regularmente fatal. En *Leishmania* se ha detectado también la MDR y la sobreexpresión de una proteína similar a la Pgp. Sin embargo, algunas especies del parásito presentan características distintas a las descritas en la MDR de mamíferos. Dos clases de genes que codifican para Pgp han sido aisladas de *Leishmania*. La primera está representada por los genes *ltppgA* y *lmpgpA* aislados de *L. tarentolae* y *L. major*, respectivamente.

Las diferencias observadas en estas dos especies son, por un lado, que la secuencia de aminoácidos de los genes mencionados presenta una homología muy baja con respecto a los genes MDR de humano. Por otro lado, en estas cepas la MDR no es revertida por verapamil. La segunda clase de genes aislados y caracterizados de *Leishmania* son los que confieren un fenotipo similar al descrito en las células MDR de mamífero. En *L. amazoniensis*, *L. donovani* y *L. enriettise*

han identificado los genes *lamdr1*, *ldmdr1* y *lemdr1*, respectivamente. El alineamiento de las secuencias proteicas codificadas por los genes mencionados muestra una alta homología con la Pgp humana. Además, al transfectar al gen *lamdr1* en parásitos sensibles a drogas se observó su sobre expresión y, como consecuencia, los parásitos transfectados adquirieron el fenotipo MDR.



Resistencia a fármacos en *T. vaginalis*

T. vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis vaginal o vaginitis. Esta es una enfermedad de amplia distribución mundial cuyo tratamiento está basado en el uso del metronidazol. Sin embargo, también en este caso se han detectado parásitos resistentes a este medicamento y, de hecho, un gen que codifica para una proteína similar a la Pgp ha sido identificado. El gen denominado *Tvpgp1* predice una proteína similar a una mitad de la Pgp de mamífero. Esto sugiere que en este ancestral organismo no hubo una duplicación del gen, como se sospecha que existió en otros eucariotas.

Resistencia a fármacos en *E. histolytica*

E. histolytica es el protozooario causante de la amibiasis en el hombre. Este parásito vive usualmente como comensal en el lumen del intestino grueso provocando amibiasis luminal pero, por razones desconocidas, es capaz de invadir la mucosa intestinal y provocar disentería, que es la forma más común de amibiasis. Una vez invadido el epitelio intestinal el parásito puede diseminarse a través de la sangre causando lesiones extraintestinales en órganos como el hígado—en donde provoca un absceso hepático—y, con menos frecuencia, en pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón.

Al igual que con otros parásitos el tratamiento contra la amibiasis es básicamente farmacológico y los dos medicamentos amebicidas más importantes son el metronidazol y la emetina. Sin embargo, en este parásito también se ha observado el fenotipo MDR. *E. histolytica* tiene al menos cuatro genes que codifican para proteínas semejantes a las Pgp de mamífero: *EhPgp1*, *EhPgp2*, *EhPgp5* y *EhPgp6*. De éstos, los genes *EhPgp1* y *EhPgp5* han sido los más estudiados ya que se ha visto que los trofozoítos con fenotipo MDR tienen una mayor expresión de ellos aunque ésta es diferente entre

ambos genes. El gen *EhPgp1* se expresa de manera constitutiva: sus niveles de expresión no cambian en las células resistentes aun cuando se adicione al cultivo celular una cantidad de droga superior a la que una célula puede resistir de manera basal. En cambio, el gen *EhPgp5* incrementa su nivel de expresión conforme se aumenta la concentración de droga en el medio de cultivo de los trofozoítos; es decir, el gen *EhPgp5* presenta una expresión inducible. Estos datos sugieren que

existe un mecanismo de regulación de expresión génica a nivel de la transcripción de ambos genes y, de hecho, ya se han identificado algunos factores proteicos involucrados en el proceso.

En parásitos como los trypanosomas y *Giardia* también se ha observado una resistencia a los fármacos empleados en el tratamiento de los padecimientos causados por estos protozoarios. Desafortunadamente, los estudios bioquímicos y moleculares realizados con respecto al fenómeno MDR no han tenido el avance mostrado en *Plasmodium*, *Leishmania* y *E. histolytica*. De hecho, tanto de *Trypanosoma spp* como de *Giardia* no se tienen plenamente reconocidos los genes participantes en el fenotipo de resistencia a drogas.

La identificación de los genes involucrados en la MDR de los parásitos descritos constituye apenas uno de los factores participantes en este complejo fenómeno. El estudio de las moléculas y los mecanismos que participan y determinan la evasión de las drogas en las células resistentes a ellas es de vital importancia ya que, en todos los casos mencionados, la similitud entre el metabolismo del huésped y el parásito ha hecho difícil el desarrollo de agentes quimioterapéuticos específicos que actúen sólo sobre el parásito y que no sean tóxicos para el huésped. El conocimiento de las diferencias moleculares y bioquímicas entre el metabolismo de ambos individuos dará la pauta para desarrollar fármacos dirigidos de manera exclusiva contra el parásito. Esto, desde luego, permitirá abrir el camino hacia el control de la diseminación de estos agentes infecciosos. En consecuencia, se tendrá la posibilidad de disminuir la alta incidencia que tienen las enfermedades parasitarias, las cuales, en la actualidad, afectan gran parte del mundo. •