DPTOS. DE ANATOMIA PATOLOGICA
Y
NUTRICION Y BROMATOLOGIA
FACULTADES DE MEDICINA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE LA CICLOSPORINA A SOBRE LINEAS CELULARES EN CULTIVO Y SU EFECTO SOBRE LOS FENOMENOS DE MULTIRRESISTENCIA A DROGAS DEPENDIENTES DE LA GLICOPROTEINA P-170

TESIS DOCTORAL

1992

Mª JOSE QUESADA VAZQUEZ

Asignaturas o cursos monográficos del Doctorado	Matriculado en		Calificaciones en los exámenes		Observaciones
	Centro	Curso	Ordinarios	Extraordinarios	

Granada, 12 de Julio de 1992

EL JEFE DEL [redacted], SECCIÓN

Conforme:
EL SECRETARIO,

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal examinador, constituído por los Jueces que suscriben la presente acta, el aspirante leyó su Tesis doctoral, que había escrito libremente y que versaba acerca del siguiente tema: **ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE LA CICLOSPORINA A SOBRE LINEAS CELULARES EN CULTIVO Y SU EFECTO SOBRE LOS FENOMENOS DE MULTIRRESISTENCIA A DROGAS DEPENDIENTES DE LA GLICOPROTEINA P-170**

Terminada la lectura y contestadas por el alumno las objeciones formuladas por los señores Jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO "CUM LAUDE".

Granada, 7 de Julio de 1992

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL,

EL PRESIDENTE,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Firma del Graduando,

MINISTERIO DE EDUCACION Y CIENCIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA — FACULTAD DE FARMACIA

Curso de 19 91 a 19 92 — Folio ..... — Núm. .....

Expediente académico para la expedición del TITULO DE DOCTOR a favor de D.ª MARIA JOSE QUESADA VAZQUEZ hijo de D. ALFREDO y de D.ª ISABEL, que nació el día 22 de Octubre de 1955 en MELILLA provincia de idem.

BACHILLER por el Instituto de Instituto Nacional de Enseñanza Media de Melilla con la calificación de Aprobado, expedido el Título por la Universidad de Granada en 14 de Marzo de 1973

Hizo los estudios de la Licenciatura en la Universidad de Granada, efectuó el examen de Licenciatura, con la calificación de NOTABLE el 2 de Julio de 1980.

Expedido el TITULO DE LICENCIADO con fecha 2 de junio de 1982

Tiene además aprobados en la Universidad de ..... los estudios del doctorado de la Facultad de Farmacia que se expresan:

Asignaturas o cursos monográficos del Doctorado	Matriculado en		Calificaciones en los exámenes		Observaciones
	Centro	Curso	Ordinarios	Extraordinarios	
Dermofarmacia y Cosmética.-	Farmac.	80-81	SOBRESALIENTE		
Valoración en medios acuosos	"	80-81	SOBRESALIENTE		
Algunos aspectos teoricos de la Toxicología	"	80-81	SOBRESALIENTE		
Bacteriología Clínica	"	80-81	SOBRESALIENTE		

(Sigue a la vuelta)

A ANTONIO
TERESA Y ANGELA

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a aquellas personas que desde el primer momento consideraron este trabajo como algo propio, constituyendo un verdadero ejemplo de trabajo en equipo.

De forma muy especial deseo resaltar:

A los directores de esta tesis doctoral, Prof. D. David Aguilar, Prof. D. Raimundo García del Moral y Profa. Dª Fátima Olea, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, así como compartir sus conocimientos y experiencias, fruto de un largo periodo de dedicación y estudio.

Al Dr. Francisco O'Valle del que he aprendido gran parte de los conocimientos adquiridos en el campo de los cultivos celulares. Su generosidad y ayuda han facilitado enormemente mi trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio experimental de c , Dr. Mariano Aguilar y Dr. Javier Lopez Hidalgo que con su trabajo en equipo y apoyo moral han facilitado en gran medida la elaboración de esta memoria.

Al Dr. Santos del Dpto. de Inmunología que generosamente colaboró con nuestro grupo en el análisis de citometría de flujo.

A los Doctores: Aneiros Cachaza, Caballero Morales, Cámara Pulido, Caracuel Ruiz, Gomez Morales y Lopez Caballero, del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, que han sabido apoyarme a nivel humano y científico.

A los Residentes y Becarios de Anatomía Patológica, Dr. Andujar, Dra. Bustos, Dr. Lucena, Dra. Medina, Dr. Ramirez y Dra. Ruiz-Avila, verdaderos compañeros y amigos.

Al personal técnico del Departamento de Anatomía Patológica: Dña Purificación Alfaro, Dña. Maria Jesús De Federico, Dña. Mª Dolores Rodriguez y Dña Francisca Saez que han sabido animarme y comprender los altibajos, así como ayudarme a resolver dudas a lo largo de la realización de esta tesis.

Al Dpto. de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia por su inestimable ayuda.

A la sección de Oncología experimental del Dpto. de Radiología y Medicina Física por compartir sus conocimientos en el campo de cultivos celulares y facilitar la elaboración de técnicas de este trabajo.

Al Dr. Antonio Montes y al Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de las Nieves, por la colaboración prestada en la elaboración del RIA.

A los compañeros del Instituto de Antequera que han suplido mis funciones durante el tiempo de realización de esta memoria de Tesis Doctoral.

Al personal administrativo, D. José Manuel Fernandez, por su insustituible colaboración.

Al cuerpo de celadores, en especial a D. José Garrido, pieza fundamental en este macroengranaje.

Al laboratorio Sandoz-Pharma S.A.E. por su apoyo en esta línea de investigación y en particular por la cesión de CsA sustancia base, no comercializada, parte del estudio de esta tesis doctoral.

A todos los que han colaborado a la finalización de la misma, muchas gracias.

INDICE

I.- *INTRODUCCION*..... 1

I-1.- CICLOSPORINA A (CsA)..... 1

I-1.1.- GENERALIDADES..... 1

I-1.2.- DESCRIPCION QUIMICA..... 2

I-1.3.- FARMACOCINETICA..... 4

I-1.3.1.- Absorción..... 4

I-1.3.2.- Distribución..... 5

I-1.3.3.- Metabolismo..... 6

I-1.3.4.- Eliminación..... 7

I-1.4.- MECANISMOS DE ACCION DE LA CsA..... 8

I-1.4.1.- Mecanismos de acción de la ciclosporina como inmunosupresor..... 8

I-1.4.2.- Mecanismos de acción de la CsA como agente antiproliferativo..... 13

I-1.5.- EFECTO ANTIPROLIFERATIVA DE LA CsA 17

I-1.5.1.- Estudio in vitro..... 17

I-1-5-2.- Estudio in vivo..... 18

I-1.5.3.- Análogos de la CsA..... 19

I-1.6.- METODOS PARA LA DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CsA Y SUS METABOLITOS..... 20

I-2.- ENSAYOS PRECLINICOS CON QUIMIOTERAPICOS ANTINEOPLASICOS..... 22

I-2.1.- MODELOS EXPERIMENTALES IN VITRO..... 22

I-2.1.1.- Evaluación morfológica del daño celular inducido por fármacos en monocapa ó cultivo de órganos.. 25

I-2.1.2.- Test in vitro para la medición de la inhibición del metabolismo celular..... 27

I-2.1.3.- Test para la medición de la incorporación de precursores radiactivos..... 28

I-2.1.4.- Test evaluador de la población celular clonogénica. 28

I-2.1.5.- Estimación bioquímica de la captación del fármaco ó de sus metabolitos generados tras su biotransformación..... 29

I-2.1.6.- Detección del fenotipo celular de multirresistencia a fármacos..... 30

I-2.1.6.1.- Glicoproteína P-170..... 30

- Estudios sobre la genética de la GP-170..... 30

- Estudios sobre la función bioquímica y fisiología de la GP-170..... 32
- Presentación en tejido normales y tumores. Valoración inmunohistoquímica y por citometría de flujo 34
- Modulación farmacológica de la MDR..... 36

I-2.1.6.2.- Otros mecanismos de resistencia..... 38

I-2.2.- MODELOS EXPERIMENTALES IN VIVO. 39

I-3.- CARACTERISTICAS DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS CELULARES Y CURVAS DE CRECIMIENTO IN VITRO..... 39

I-4.- ESTIMACION DE LA FRACCION DE CRECIMIENTO CELULAR..... 41

I-4 1.- METODOS DE EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR..... 41

I-4.1.1.- Contaje de mitosis..... 41

I-4.1.2.- Contenido en ADN..... 41

I-4.1.3.- Métodos histoquímicos..... 42

I-5.- EFECTOS BIOLOGICOS DE LOS DISOLVENTES UTILIZADOS EN LA PREPARACION DEL FARMACO (CsA)..... 43

I-5.1.- ETANOL..... 43

I-5.2.- ACEITE DE RICINO POLIOXIETILADO (CREMOPHOR). 43

I-6.- FUNDAMENTOS TECNOLOGICOS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO..... 44

I-7.- INTRODUCCION GENERAL AL ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES.ANALISIS DE IMAGENES DIGITALIZADAS, FUNDAMENTOS BASICOS SOBRE DIGITALIZACION Y TRATAMIENTO DE IMAGENES..... 46

I-7.1.- ADQUISICION DE LAS IMAGENES..... 47

I-7.2.- DIGITALIZACION DE LA IMAGEN..... 47

I-7.3.- PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE LAS IMAGENES..... 48

I-7.3.1.- Técnicas de análisis de imagen mediante operadores puntuales..... 48

I-7.3.2.- Técnicas de análisis de imagen mediante operadores locales..... 49

I-7.3.3.- Técnicas de análisis de imagen mediante operadores globales..... 49
I-7.4.- SEGMENTACION Y CLASIFICACION DE LA IMAGEN. 49
I-7.5.- PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN BINARIA..... 50
I-7.6.- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS ANALITICOS. 50
- *OBJETIVOS*..... 52
II. *MATERIAL Y METODOS*..... 53
II-1.- MATERIAL BIOLOGICO. 53
II-1.1.- LINEAS CELULARES..... 53
II-1.1.1.- Línea HeLa..... 53
II-1.1.2.- Línea MCF-7..... 54
II-1.1.3.- Línea SK Mel-5..... 55
II-1.1.4.- Línea B-16..... 55
II-2.- FARMACO ENSAYADO..... 58
II-3.- MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE LINEAS CELULARES EN NUESTRO LABORATORIO..... 58
II-3.1.- CULTIVO CONTINUO DE CELULAS..... 58
II-3.2.- CRIOPRESERVACION..... 60
II-3.3.- CULTIVO DE CELULAS EN PLACAS DE MICROTITULACION..... 61
II-4.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACION CELULAR EN CULTIVO..... 61
II-5.- SCREENING DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO SOBRE MICROCULTIVOS MEDIANTE TECNICA COLORIMETRICA (MTT)..... 61
II-5.1.- REACTIVOS..... 62
II-5.2.- DESCRIPCION DE LA TECNICA..... 62
II-5.3.- CONTROLES..... 62
II-5.4.- ELABORACION DE LA CURVA PATRON..... 63
II-6.- DETERMINACION DE LA EXPRESION DE LA GLICOPROTEINA DE MEMBRANA (GP-170) MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO (CF)..... 64
II-6.1.- MUESTRAS. 64
II-6.2.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA..... 64
II-6.2.1.- Reactivos..... 64
II-6.2.2.- Descripción de la técnica..... 65
II-6.2.3.- Controles de la técnica.....

II-6.2.4.- Lectura de resultados..... 65

II-6.3.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. 66

II-6.3.1.- Reactivos..... 66

II-6.3.2.- Descripción de la técnica..... 66

II-6.3.3.- Controles de la técnica..... 67

II-6.3.4.- Lectura de resultados..... 67

II-7.- DETERMINACION DE CsA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO..... 67

II-7.1.- REACTIVOS..... 67

II-7.2.- DESCRIPCION DE LA TECNICA..... 68

II-7.3.- CONTROLES..... 69

II-7.4.- LECTURA DE RESULTADOS..... 69

II-8.- ANALISIS DE IMAGEN..... 70

II-8.1.- REACTIVOS..... 70

II-8.2.- MATERIAL..... 70

II-8.3.- PROCEDIMIENTO TECNICO..... 71

II-8.4.- CONTROLES..... 71

II-9.- MEDIOS EMPLEADOS..... 72

II-10.- OBSERVACIONES DE CARACTER GENERAL..... 74

II-11.- ANALISIS ESTADISTICO..... 74

III RESULTADOS..... 76

III-1.- CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES HELA, MCF-7, SK MEL-5 Y B-16..... 76

III-1.1.- INFLUENCIA DE LA LINEA CELULAR..... 76

III-2.- ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA CsA SOBRE LAS LINEAS CELULARES HELA, MCF-7, SK MEL-5 Y B-16..... 83

III-2.1.- CURVAS DOSIS RESPUESTA DE LAS LINEAS CELULARES ENSAYADAS..... 83

III-3.- VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA DE GP-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO..... 102

III-3.1.- ANALISIS DESCRIPTIVO DE RESULTADOS..... 102

III-4.- RESULTADOS DEL ANALISIS DE IMAGEN SOBRE LOS CULTIVOS CELULARES..... 139

III-4.1.- RESULTADOS DE CUANTIFICACION MORFOMETRICA. 139

III-4.2.- RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE LA TEXTURA GRANULAR..... 144

III-5.- DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CsA Y SUS METABOLITOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVOS..... 160

IV. DISCUSION GENERAL..... 161

IV-1.- DISCUSION SOBRE LOS ENSAYOS DE QUIMIOSENSIBILIDAD IN VITRO..... 161

IV-2.- DISCUSION SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES ENSAYADAS EN CULTIVO Y EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA CsA 166

IV-3.- DISCUSION SOBRE LA VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA DE GP-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO..... 170

IV-4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL ANALISIS DE IMAGEN..... 175

IV-5.- DISCUSION SOBRE LA DETERMINACION DE CsA MEDIANTE RIA..... 184

V. CONCLUSIONES..... 187

VI. BIBLIOGRAFIA..... 189

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

I-1.- CICLOSPORINA A (CsA).

I-1.1.- GENERALIDADES.

A principios de 1970, en el departamento de Microbiología de Sandoz S.A. , Basilea, se aislaron dos nuevas cepas de hongos imperfectos tras el análisis de varias muestras de tierra procedentes de Wisconsin (U.S.A.) y Hardamger Vidda (Noruega). Una de ellas, el Cylindrocarpon lucidum Booth, sólo crece en cultivos de superficie por lo que se abandonó su estudio. La otra cepa fue clasificada originalmente como Trichoderma polisporum Rifai, pero su nombre taxonómico correcto es Tolypocladium inflatum Gams. Ambos hongos sintetizan CsA, pero solamente esta última cepa crece en cultivos sumergidos, siendo apropiada para la producción a gran escala de CsA por fermentación (Stähelin, 1986).

En 1976, Jean Borel descubrió que la CsA tenía una gran actividad inmunosupresora in vitro e in vivo (Kahan & Grevel, 1988).

La introducción de la CsA proporciona un enfoque completamente nuevo dentro del ámbito de la inmunosupresión, por su alta capacidad selectiva para inhibir la activación de las células T (Borel et al, 1976) (Borel, 1983) (Shevach, 1985) (Kahan & Bach, 1988), sobre todo helper ó coadyuvantes, que es generalmente atribuida a la inhibición de la síntesis de varias linfocinas, especialmente interleucina-2 (IL-2), una molécula clave en el desarrollo de la inmunorespuesta.

A diferencia de los fármacos usados previamente en el trasplante de órganos, la CsA a dosis terapéuticas no es citotoxica ni produce mielosupresión (Helin & Edgington, 1984).

En virtud de lo anteriormente expuesto y desde 1978 (Calne et al, 1978), la CsA se ha hecho imprescindible en la prevención del rechazo de órganos trasplantados, en particular en injertos renales (Helderman et al, 1985), hepáticos (Wonigeit et al, 1984), cardíacos (Cooley et al, 1983) (Oyer et al, 1983), de páncreas (Traeger et al, 1984), médula ósea (Hows et al, 1982) e intestino delgado (Deltz et al, 1984).

Sin embargo, el espectro de actividad biológica de la CsA es mas amplio, reconociéndose efecto antiparasitario, antifúngico, antiinflamatorio (Borel & Ryffel, 1985) y antiproliferativo sobre queratinocitos (CCs) en cultivos de distintas zonas y sobre líneas celulares de estirpe epitelial

cuando se emplea a dosis altas (Borel, 1988). Este fenómeno es el que sustenta el uso clínico de la CsA en el tratamiento del psoriasis (Ellis et al, 1986) y otras dermatosis como la ictiosis vulgar (Velthuis & Jesserun, 1985). Paradójicamente, posee una acción estimulante sobre los QCs localizados en los folículos pilosos, ocasionando una hipertricosis.

Se puede decir que con la CsA comienza la fase de la inmunofarmacología, caracterizada por la inmunorregulación selectiva mediante el empleo de sustancias ó métodos que, específicamente, modulan subpoblaciones definidas de células inmunocompetentes. Desde entonces, la inmunofarmacología ha desarrollado nuevas vías con la aparición de agentes con acción selectiva sobre la adquisición de respuesta inmunológica, reconocimiento de estímulos inmunológicos por células receptoras, inducción de diferenciación y maduración de linfocitos, interacciones celulares y modulación de funciones efectoras. Sin embargo, la CsA continúa siendo la primera droga en importancia que cumple totalmente estos requerimientos en alguna extensión (Borel, 1983).

I-1.2.- DESCRIPCION QUIMICA.

Al examinar la estructura química de la CsA, se observa que se trata de un endecapéptido cíclico de peso molecular 1202 ($C_{62}H_{111}O_{12}$), neutro y lipofílico, por lo que solamente es soluble en lípidos y algunos disolventes orgánicos. De los 11 residuos de aminoácidos que constituyen su molécula (fig 1). 7 son N-metilados, 10 son aminoácidos alifáticos conocidos (Calne et al., 1973) y uno es un nuevo aminoácido de 9 carbonos muy especial (Kahan et al., 1983), ubicado en posición 1. Este aminoácido, desconocido hasta el aislamiento de CsA, es un derivado de la treonina, 4-butenil-4-metil-treonina, abreviadamente Bmt ó puesto que es N-metilado, MeBmt (Wenger, 1986) (Wenger, 1990).

Estudios químicos de modificaciones realizadas sobre la molécula de CsA sugirieron que la zona activa del fármaco se localiza en la región hidrofílica, conteniendo los aminoácidos 1, 2, 3 y 11 (Wenger, 1983). Tras el análisis de muchos derivados naturales y sintéticos de la CsA, se ha llegado a la conclusión de que la porción activa de esta molécula contiene también el residuo en posición 10 (Wenger, 1990).

A partir del análisis mediante rayos X, quedó establecido que la molécula de CsA presenta una conformación en lámina plegada ß antiparalela, de residuos 1 a 6 y otra en bucle abierto de residuos 7 al 11 (Wenger, 1982).

Mas recientemente, la conformación de la CsA ha sido determinada experimentalmente

en estado sólido por medios de difracción de rayos X y por resonancia nuclear magnética (RNM) en solución no acuosa (Wenger, 1990). Estas conformaciones difieren de forma importante en la proyección de la cadena MeBmt. En el cristal, esta cadena está doblada por debajo del pliegue de la lámina ß, mientras que en solventes apróticos sale fuera del cuerpo de la molécula. Esta diferencia está originada por una simple rotación de 120º sobre el enlace C_α-C_β.

R. M. Wenger (1990) estudia cuai de las dos conformaciones experimentalmente determinadas es la mejor en orden a su relevancia para la actividad biológica, y llega a la conclusión de que la conformación deducida por difracción de rayos X es una buena base para la comprensión de la relación entre la estructura de la CsA y su actividad biológica.

La CsA tiene un solo residuo D-aminoácido en posición 8 y el residuo metil-amido entre los residuos 9 y 10 está en la configuración cis, en tanto que todos los demás residuos metil-amido están en la forma trans (Handschumacher, 1991).

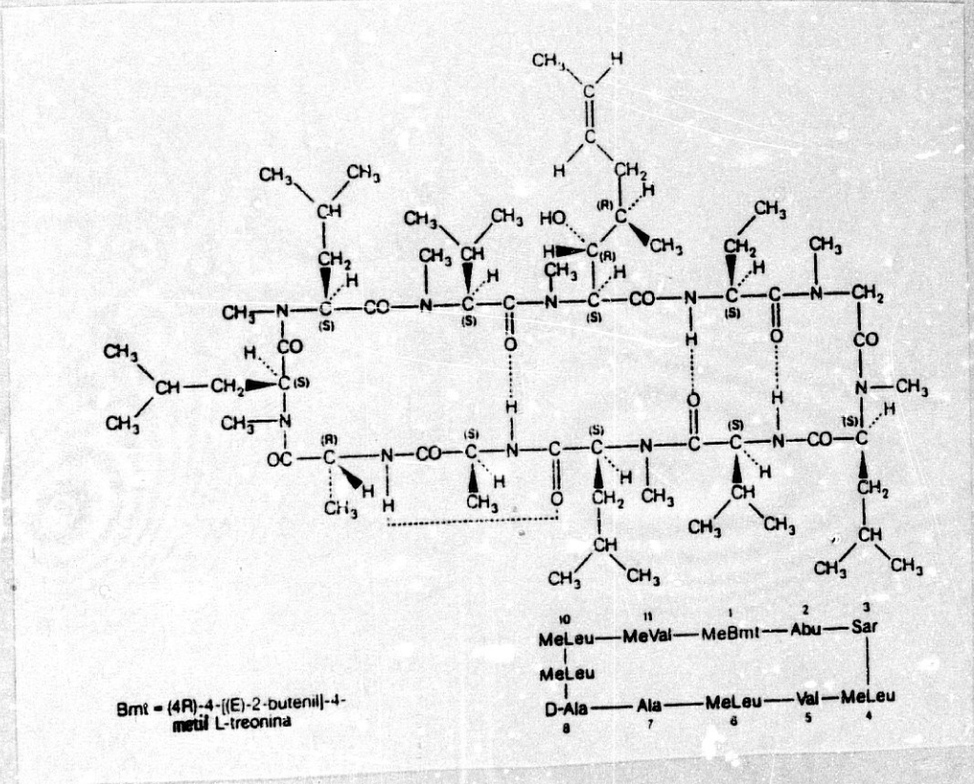


FIGURA 1.- FORMULA ESTRUCTURAL DE LA CsA

I-1.3.- FARMACOCINETICA.

Aunque a este respecto existen numerosos trabajos en relación con humanos y animales de experimentación, los conocimientos sobre el comportamiento de la droga a nivel subcelular son mucho menos completos. Por ello, inicialmente se realiza una revisión de la farmacocinética clínica para ulteriormente, desarrollar algunos aspectos del comportamiento intracelular del fármaco (ver apartado I-1.4.)

I-1.3.1.- Absorción.

Parece ser que la absorción oral de CsA se produce solamente en la parte superior del intestino delgado (Atkinson et al, 1983) (Grevel et al, 1986) (Kahan, 1989a) (Morales & Andres, 1991), en contra de lo que expresan algunos autores (Le Bigot et al, 1987) de que el papel fundamental lo juegan los vasos linfáticos del ileón distal.

La absorción es lenta e incompleta, aproximadamente del 30% (Kahan, 1989a), con un pico en plasma observado 2-4 horas después de la administración.

Los hallazgos obtenidos por Reymond (1986) en un modelo de rata in situ y el análisis de la farmacocinética obtenida en sujetos sanos (Grevel et al, 1986), evidencian que la CsA se absorbe desde el tracto intestinal con una tasa constante (absorción de orden cero). Esta cinética de orden cero, en sólo algunas partes del intestino delgado, podría dar también como resultado un aumento de la biodisponibilidad con pequeñas dosis de CsA.

La solución oral y las cápsulas de gelatina han mostrado una absorción y bioactividad equivalente de ambas formulaciones (Nashan et al, 1988).

La equivalencia de la dosis oral e intravenosa es 1-3 (Morales y Andrés, 1991).

La absorción tras la inyección subcutánea e intramuscular es insignificante (Beveridge et al, 1981).

La variabilidad es observada a la vez en la proporción y extensión de la absorción. Debido a la gran variabilidad en la absorción de cada paciente durante el tratamiento crónico con CsA oral, deben medirse los niveles de CsA en sangre, con el fin de mantener los niveles terapéuticos y minimizar los efectos secundarios (Kahan, 1984). Este rango terapéutico es muy estrecho, de 100-250 ng/ml con los modernos test de RIA empleando AcMo y solo el 50% de los pacientes

que mantienen estos niveles están exentos de complicaciones (Kahan, 1989a).

Existen grandes variaciones en los datos de la biodisponibilidad, según los autores y el tipo de trasplante. La biodisponibilidad absoluta en pacientes con trasplante renal varía de un 5-60% con una media del 30% (Kahan, 1984), siendo menor que en los trasplantes de médula ósea y similar a los hepáticos (Chamorro y cols., 1987). A este respecto, parece que la biodisponibilidad aumenta durante el tratamiento (Kahan et al, 1983), de forma que aumentos de 3-5 veces en la biodisponibilidad han sido observados después de un período de 3 semanas de administración del fármaco (Kahan, 1984).

Aunque existen múltiples factores que pueden modificar la absorción de CsA, no todos los autores coinciden en ellos. Al parecer, el tratamiento con colesteramina, la presencia de colestasis (Venkataramanan et al, 1985), el aumento de la movilidad gastrointestinal (Wadhwa et al, 1987), la esteatorrea, la disminución de la secreción exocrina pancreática y el drenaje externo de la bilis (Burckart et al, 1986), disminuyen la absorción de la CsA. Sin embargo, la presencia de niveles normales de lipoproteinas de baja densidad y el tratamiento prolongado promueven la absorción del fármaco (Kahan, 1989a). No está clara la influencia de la ingesta de alimentos en la absorción de CsA. Algunos estudios demuestran que la presencia de alimentos en el estómago disminuye la absorción aproximadamente un 25% (Keown & Stiller, 1988), mientras que otros consideran que no existe influencia alguna (Wood & Lemaire, 1985) ó incluso, que la administración de CsA con la comida favorece la absorción (Ptachcinski et al, 1985) (Kahan, 1989a).

I-1.3.2.- Distribución.

Una vez absorbido el fármaco en el tracto gastrointestinal, pasa al compartimento vascular donde la fracción mayor de CsA va unida a las células. Los eritrocitos contienen entre el 60% y 70% del fármaco presente en sangre y los linfocitos entre el 10 al 20% de la CsA circulante (Handschumacher, 1991). Otros trabajos revisados consideran que los granulocitos contienen el 5% y los linfocitos otro 5% (Niederberger et al, 1983). Cuando las concentraciones de CsA en plasma superan los 100 ng/ml, la capacidad de unión se satura (Foxwell et al, 1988). El remanente de fármaco circula unido a las lipoproteinas (Lemaire et al, 1982) de alta, baja ó muy baja densidad (34%, 34% y 10% respectivamente) y a los quilomicrones (Gurecki et al, 1985) (Ryfell et al, 1988). Una pequeña fracción circula libre en el plasma y no se correlaciona con los niveles de CsA en sangre total ni con los efectos secundarios.

Si los niveles de colesterol son menores de 120 mg/dl, los posibles efectos tóxicos de la

CsA en el sistema nervioso central pueden aumentar (De Groen et al, 1987).

La CsA tambien es secuestrada por los tejidos (Atkinson et al, 1983) (Kahan et al, 1983) (Ried et al, 1983) (Ptachcinski et al, 1986) y aunque la extensión del depósito hístico varía mucho de un paciente a otro, el volumen de distribución es de 4,8 l/Kg de peso corporal (Morales y Andrés, 1991). El hígado es el órgano de mayor depósito del fármaco (Bowers & Canafax, 1984) seguido por páncreas, grasa, sangre, corazón, pulmón, riñón, tejido nervioso y músculo (Morales & Andrés, 1991).

I-1.3.3.- Metabolismo.

La CsA se metaboliza en el hígado a través del sistema enzimático citocromo P-450 (Maurer, 1985) (BurcKart et al, 1986) (Maurer & LeMaire, 1986), que muestra distinta actividad enzimática según la edad del sujeto (Grevel, 1988).

Estudios hechos con cromatografía líquida han medido hasta un total de 18 metabolitos en sangre, hígado, corazón, riñón, médula, bilis y orina, siendo identificada claramente la estructura de 11 de ellos (Maurer & Lemaire, 1986) (Christians et al, 1988) (Wang et al, 1988).

Los metabolitos de la CsA se originan por oxidación extensa de las cadenas laterales mediada por el citocromo P-450 (Aoyama et al, 1989).

Estudios mas recientes realizados por Wenger (1990), hacen referencia a cinco puntos fundamentales de ataque oxidativo, localizados en la cara opuesta de la parte activa de la molécula de CsA. Por incubación de la CsA con microsomas de hígado, se demuestra que los primeros productos de oxidación son los metabolitos M17, M1 y M21, oxidados en posición 1, 9 y 4 (N) respectivamente. Una mayor oxidación de éstos podría dar lugar a M8 (oxidado en 1 y 9), M10 (oxidado en 4 y 9) y M13 (oxidado en 4 (N) y 9). En orina humana se han aislado 2 metabolitos fundamentales mas, M9 y M16, ambos oxidados en posición 6, los cuales podrían ser considerados como productos del M13 y M1 respectivamente. Realizando todas las combinaciones posibles, Wenger considera que existen 21 metabolitos mono y dioxidados producto de la CsA, de los cuales 11 han sido aislados desde hace tiempo y un razonamiento similar le conduce a un total de 41 metabolitos de CsA, mono, di y trioxidados, que espera aislar en su totalidad en breve tiempo.

Los metabolitos recirculan en la sangre, vuelven al hígado, posteriormente se introducen en el arbol biliar y se dirigen al intestino donde pueden ser reabsorbidos (Le Bigot et al, 1987)

(Keown & Stiller, 1988).

Algunos metabolitos parecen tener un poder de inmunosupresión mayor que el fármaco de origen, puesto de manifiesto en estudios de cultivos mixtos de linfocitos (Zeevi et al, 1988), aunque la contribución de los metabolitos en el efecto inmunosupresivo global es probablemente menor que el de la CsA nativa (Ryffel et al, 1988). Sin embargo, aún queda por establecer cuál es el papel de estos metabolitos en los efectos terapéuticos ó tóxicos del fármaco (Freed et al, 1987) (Ryffel et al, 1988).

La administración concomitante de otros fármacos que interactúan con el sistema P-450 puede afectar al metabolismo de la CsA. Así, inhibidores del sistema enzimático citocromo P-450 que pueden aumentar los niveles de CsA incluyen: Algunos antagonistas del calcio, como el diltiazem, verapamil (Kohlhaw et al, 1988) (Wagner et al, 1988) y nicardipina (Bourbigot et al, 1986), contraconceptivos orales (Deray et al, 1987), ketoconazol (Dieperink & Moller, 1982), eritromicina (Harnett et al, 1987) (Morales et al, 1987), andrógenos y metilprednisolona (Klintmalon et al, 1984). Por otra parte, los agentes que producen inducción enzimática del sistema P-450 originan disminución de los niveles de CsA, tal es el caso de la rifampicina (Daniel et al, 1984), fenobarbital, fenitoina (Patchcinski et al, 1985), carbamacepina (Lele et al, 1983) y valproato.

I-1.3.4.- Eliminacion.

La cantidad de CsA ó de sus metabolitos que aparece en la orina es escasa (Wood et al, 1983), representando aproximadamente el 6% de la dosis (Morales & Andrés, 1991). La excrección fundamental es a través de las heces, procedente de la bilis (Maurer, 1985) (Burckart et al, 1986) (Maurer & LeMaire, 1986) (Chamorro et al, 1987). La vida media de depuración en sangre es de 6,4-8,7 horas, aunque se han observado variaciones muy amplias para todos los parámetros farmacocinéticos (Kahan & Grevel, 1988) (Vine & Bowers, 1988).

El aclaramiento, de bajo a intermedio, es muy variable y está influenciado por el tipo de trasplante, estado de la enfermedad, edad del paciente y medicación asociada (Kahan, 1989a). Asimismo, existen diferencias diurnas en el aclaramiento de CsA, de forma que parece ser mayor durante la última parte de la noche y por la mañana temprano que durante el día. Esto indica la necesidad de monitorizar los niveles a la misma hora cada día en un paciente individual.

El 78% de la variabilidad en el aclaramiento podría ser explicado haciendo una regresión lineal múltiple usando dos parámetros, la tasa de triglicéridos y la de LDL-colesterol (Lithell et

al, 1986).

El estado funcional del hígado influenciará la eliminación del fármaco. Se ha demostrado que cuando los niveles de bilirrubina están elevados, se reduce el aclaramiento para la CsA. Esto mismo ocurre cuando aumenta la actividad enzimática de la alanino aminotransferasa (Grevel, 1988), por lo que en estos casos son necesarios intervalos mas dilatados entre las dosis de CsA (Kahan, 1989a).

Por el bajo nivel de excrección urinaria, la insuficiencia renal no altera la eliminación de CsA por esta vía, por lo que no será necesario modificar la dosis en pacientes con fallo renal. La CsA no se elimina del organismo mediante hemodiálisis (Venkataramanan et al, 1985) (Kahan, 1989a).

I-1.4.- MECANISMOS DE ACCION DE LA CsA.

A pesar del número creciente de estudios realizados, el mecanismo de acción preciso de la CsA a nivel molecular permanece sin aclarar. Existen muchos datos relativos a los mecanismos de acción de la CsA como inmunosupresor (Borel & Ryffel, 1985) (Drugge & Handschumacher, 1988) (Hess et al, 1988) y muchos menos concernientes a la actividad antiproliferativa de la CsA. Se puede especular que al menos parte de los mecanismos moleculares responsables de la actividad inmunosupresora y de la antiproliferativa de la CsA pueden ser compartidos. De hecho, un efecto antiproliferativo sobre células inmunocompetentes (tales como CD4+) conducirá indefectiblemente a una inmunosupresión (Kanitakis & Thivolet, 1990).

I-1.4.1.- Mecanismos de acción de la ciclosporina como inmunosupresor.

La CsA altera selectivamente la respuesta inmune interfiriendo directamente con la función de los linfocitos T (Lillehoff et al, 1984) (Bennett & Norman, 1986) (Kahan, 1989). La acción predominante de la CsA va dirigida contra las poblaciones de células T colaboradoras (Helper) (Kay y Benzie, 1984), (Lillehojf et al, 1984). Este efecto en las células T-helper previene la producción de varias linfoquinas, tales como IL-2, IL-3, IL-4 y gamma interferon (Morris, 1991), siendo la IL-2 (Borel, 1976), la mas estudiada hasta el momento. La inhibición en la formación de linfoquinas, especialmente IL-2, impide por tanto la liberación de las segun señales necesarias para la maduración de las células T y B, suprimiendo la proliferación y generación de los linfocitos T citotóxicos.

La síntesis de IL-2 está disminuida, in vitro, (Hess et al, 1982) mediante una única

exposición de CsA e, in vivo, en receptores de trasplante de médula ósea (Azogui et al, 1983) y de riñón que reciben crónicamente CsA (Yoshimura & Kahan, 1985).

En orden a testificar la hipótesis de que la inhibición de la producción de IL-2 es un efecto crítico inmunosupresor de la CsA, se hizo reaccionar una sonda de c-ADN construida contra m-ARN IL-2, con extractos citoplasmáticos de linfocitos de pacientes tratados con CsA, mediante un ensayo de Northern-blot. Se demostró que el componente m-ARN IL-2 actúa como un potente depresor en pacientes tratados con CsA (Yoshimura et al, 1987).

Aunque la CsA inhibe la formación de IL-2, tiene poco efecto sobre la expresión del receptor de superficie de membrana de baja afinidad para IL-2, -CD25- (Miyawaki et al, 1983) (Kermani-Arab et al, 1985). Este receptor, después de la unión con IL-2, se elimina en el suero ó alternativamente se interioriza. Los niveles en suero del receptor de IL-2 en voluntarios normales, en candidatos pretrasplantados con enfermedad renal en estadio terminal y con función del injerto renal estable postrasplante y en individuos que padecen nefrotoxicidad inducida por la droga, están alrededor de 300±200 U/ml. En contraste, pacientes sufriendo activación inmune causada por rechazo agudo ó en respuesta a agentes infecciosos, muestran niveles del receptor de IL-2 mayores de 1000 U/ml (Smith et al, 1989). Por tanto, el receptor de IL-2 libre en suero, ó incluso mas sensiblemente, el índice de este nivel con el nivel de CsA en suero, proporciona un dato útil para diagnosticar la activación inmune en pacientes trasplantados. Además, estos hallazgos confirman observaciones previas de que, pacientes recibiendo dosis terapeúticas de CsA, muestran niveles normales del receptor de baja afinidad para IL-2 (Kahan, 1989b).

Sin embargo, otros autores consideran que la CsA puede adicionalmente involucrar un efecto sobre la formación del receptor de IL-2 (Granelli-Piperno et al, 1987) ó inhibir su expresión (Herold et al, 1986), sobre todo en lo referente a su cadena ß ó receptor de alta afinidad para la IL-2.

In vivo, la terapia con CsA inhibió la capacidad de las células de los pacientes para generar gamma interferon (Kahan et al, 1987). En este sentido, los linfocitos de pacientes con enfermedad renal en estadio terminal bajo estimulación con fitohemaglutinina (PHA), produjeron 1100 U/ml de gamma interferon. Por el contrario, y tras una semana de postrasplante, los linfocitos activados con PHA derivados de pacientes bajo terapia de CsA-prednisona, secretaron menos de 50 U/ml de gamma interferon. La capacidad para producir gamma interferon permaneció deprimida durante 12 semanas de postrasplante en aproximadamente 100 U/ml, creciendo después a 600 U/ml a las 14 semanas de postrasplante y al valor de pretrasplante entre las 16 y 20 semanas.

La CsA inhibe indirectamente la función monocítica al suprimir la producción de linfoquinas, tales como α-interferon por parte de linfocitos T4 (Reem et al, 1983), el factor inhibidor de los macrófagos (Helin & Edgington, 1984), el factor quimiotáctico de los macrófagos (Granelli-Piperno et al, 1984) y la actividad procoagulante macrofágica (Keown & Stiller, 1988). Asimismo, la producción de IL-1 por los monocitos está inhibida (Palacios, 1982), sin que se conozca si es debido a un efecto directo concomitante sobre el macrófago.

Se ha descrito que la CsA inhibe la generación de los factores de crecimiento de los linfocitos B (IL-5 y IL-6) (O'Garra et al, 1986), y también se ha observado que este fármaco inhibe "in vitro" la activación de los linfocitos B por anticuerpos antiinmunoglobulinas (Muraguchi et al, 1983) (Klaus & Harwrylowicz, 1984). Es probable que la CsA impida el primer paso en la activación de las células B vía receptores de Ig sobre la superficie de la célula.

El mecanismo molecular de la acción de la CsA, inhibiendo a la vez la producción de IL-2 y síntesis de enzimas capaces de mediar la función citotóxica, no está claro. La CsA no afecta a la unión inicial del antigeno de membrana a los receptores de las células T, ó a su transducción a través del complejo receptor CD3 a proteina G, con activación de fosfolipasa C y catálisis de difosfato fosfoinositol a trifosfato fosfoinositol y 1,2 diacilglicerol. Además, la activación de la proteinquinasa C y la liberación de las reservas internas de Ca^{2+} no son deprimidas por la CsA. Aunque puede haber efectos posteriores sobre la permeabilidad del canal de Ca^{2+}, no hay evidencia de efectos tempranos (Kahan, 1989b). Mas recientemente, se ha observado que la CsA inhibe la formación de la señal de activación citoplásmica, lo cual provoca frenaje de la incorporación de timidina tritiada en el núcleo. Un efecto variable de la droga previene a los núcleos de las células tratadas con CsA de responder como responde un citoplasma normal activado. El nivel de esta inhibición refleja las concentraciones intranucleares de CsA ya que núcleos conteniendo 43±3 ng/ml de CsA, usando el radioinmunoensayo policlonal no selectivo de oveja, mostraron poca inhibición, y sin embargo núcleos con 126±49 ng/ml presentaron un 35% de reducción, (Citterio & Kahan, 1989). Puesto que estas diferencias interindividuales en el componente nuclear de CsA fueron observadas tras incubación con una dosis de 1000 ng/ml de CsA, la respuesta nuclear inhibida reflejó probablemente diferencias de avidez por el receptor (Kahan, 1989b).

Una vez que la CsA penetra en la célula, probablemente contacta con algunas proteinas citosólicas, de las cuales las más conocidas son la Calmodulina (CaM) y la Ciclofilina (CYP).

Fueron Colombani y colaboradores (1985), quienes describieron por primera vez la posible relación entre el efecto inmunosupresor de la CsA y la unión de esta droga a la CaM,

con la consecuente interferencia con el Ca^{2+}. Algunos estudios posteriores que investigaron el posible efecto e interacción entre antagonistas y bloqueantes de la CaM y la CsA (Colombani et al, 1987), reafirmaron la idea de que una alteración del contenido intracitoplasmático de Ca^{2+} por alteración de la CaM al unirse con la CsA, conducen a un defecto en los primeros pasos de la activación de los linfocitos quiescentes sometidos a inmunoestimulación. Sin embargo, no todos los trabajos llegaron a estas conclusiones, minimizando e incluso negando que esta unión tuviera relevancia en dicho mecanismo (Le Grue et al, 1986) (Foxwell et al, 1988) (Quesniaux et al, 1988).

La CYP (Foxwell et al, 1988) (Harding & Handschumacher, 1988) (Quesniaux et al, 1988) es una proteina de peso molecular 17.737, con estructura terciaria globulosa y un contenido hidrófobo a manera de core (Dalgarno et al. 1986) en su interior y que ha sido descrita como la principal molécula a la que la CsA se une a nivel citoplasmático (Handschumacher et al, 1984) (Harding & Handschumacher, 1988) de manera estereoespecífica. Respecto a su estructura secundaria, se observa una alternancia del patrón de hélice alfa y de estructura de beta plegada (Harding & Handschumacher, 1988). La CYP contacta con los residuos de la CsA números 1, 2, 10 y 11 que, junto con el 3, son los necesarios para que esta droga tenga acción inmunosupresora (Quesniaux et al, 1988) (Hsu et al,1990). Los estudios de NMR 1H sugieren que dicha unión provoca cambios en la estructura de la CYP, sobre todo en los restos metílicos y aromáticos (Dalgarno et al, 1986) (Hsu et al, 1990), con una fuerte correlación entre dicha acción inmunosupresora y el nivel de unión de la CsA con la CYP, hecho que no se ha encontrado para la CaM (Quesniaux et al, 1988).

La CYP también se ha descrito en células no inmunes de mamíferos como los murinos (Merker et al, 1983), sobre todo a nivel de riñón, ganglios linfáticos y cerebro, detectándose también en QCs. Kolestsky y colaboradores (1986), han aumentado el espectro de tejidos normales a tejidos tumorales, entre los que se incluyen líneas de carcinomas epidermoides y otras neoplasias de estirpe epitelial, así como en otras especies filogenéticamente distintas, creyéndose que los genes que la codifican pertenecen a una familia multigenética. Todos estos datos indican que la CYP es una molécula filogenéticamente primitiva y por ello pudiera estar implicada en procesos celulares muy primarios, con una amplia repercusión fisiológica.

Entre los efectos que la CYP tienen en la bioquímica celular caben destacar los siguientes: a) Actividad proteinquinasa (Hannink & Donoghue, 1985), y autores como Harding y Handschumacher (1988) sugieren que la CYP podría actuar como una fosfotransferasa, pudiendo ejercer esta actividad sobre otras proteínas, entre las que se citan las histonas; b) Actividad peptidil-propil-cis-trans isomerasa, interviniendo en la isomerización de la prolina durante la

síntesis de proteínas (Takahashi et al, 1989) (Moore et al, 1991) (Steinmann et al, 1991a) (Steinmann et al, 1991b) y c) Acción inhibitoria del activador de replicación del ADN (Wong et al, 1987) (Kimball et al, 1991). La unión CsA-CYP parece alterar todas estas funciones, aunque se desconoce su efecto final.

El hecho de que la acción inmunosupresora de la CsA puede ejercerse merced a su unión específica con CYP, que como se ha mencionado contribuye al plegamiento de otras proteínas por su actividad isomerasa (Harding & Handschumacher, 1988) (Takahashi et al, 1989), retardaría la formación de la estructura terciaria de numerosos mediadores proteícos fundamentales, en los estadios iniciales de la activación de los linfocitos T cooperadores (Steinmann et al, 1991a) (Ringe, 1991). No obstante, existe gran controversia en esta teoría y muchos de sus puntos permanecen oscuros.

La reciente descripción de que el gamma interferón tiene un papel regulador de la síntesis colágena actuando a nivel transcripcional como inhibidor de la expresión genética de dichas proteínas, apoya la hipótesis anterior y abre nuevas perspectivas acerca de la cuestión, ya que el gamma interferón podría actuar como una señal de parada en el proceso de fibrogénesis (Kovacs, 1991). En este sentido, se ha señalado que disminuye la actividad mitogénica del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) sobre los fibroblastos. Por todo ello, cabe la posibilidad de que la fibrosis incrementada, que acontece en el curso de la toxicidad crónica por CsA, sea mediada por un deficit crónico de gamma interferón, dependiente del efecto inmunosupresor provocado por la CsA. Este efecto supondría una demostración indirecta de los múltiples mecanismos de regulación celular en los que es capaz de interferir la CsA.

Otros mecanismos de la inmunosupresión dependientes de CsA pueden operar al nivel del timo y/ó de la formación de células supresoras. En este sentido, la terapia con CsA inhibe la médula tímica, interfiriendo por tanto con el proceso por el cual los linfocitos aprenden a reconocer lo propio (Hess et al, 1985). Además, la CsA fomenta la producción por células tímicas de hormonas humorales supresoras, que pueden regular a la baja la respuesta sistémica inmune (Dardenne et al, 1987). Por ello, existe un gradual crecimiento en la actividad postrasplante de las células supresoras, posiblemente fomentado en parte por el aumento de la producción de hormonas tímicas y el desequilibrio tímico medular, favoreciendo la maduración de linfocitos tímico-derivados hacia el camino supresor y/ó por producción creciente de prostaglandinas por células adherentes (Whisler et al, 1984). La producción creciente de prostaglandina E-2 puede disminuir la síntesis de IL-1 y la expresión de los antígenos de superficie HLA-Dr, asi como aumentar la formación de AMP cíclico, inhibiendo por tanto la necesaria actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC) para la formación de poliamina (PA) y

síntesis de ADN. Además, la CsA prescinde de la generación de células supresoras tanto in vitro (Hess & Tutschka, 1980), como in vivo (Van Buren et al, 1982), permitiendo la aparición de elementos que regulan a la baja la activación de la células T-Helper, vía producción de receptores antiidiotipo ó antiantigeno.

I-1.4.2.- Mecanismos de acción de la CsA como agente antiproliferativo.

Numerosos datos experimentales proponen como principales mecanismos de acción de la CsA como agente antiproliferativo a: 1) Detención de las células sensitivas en fase G_0/G_1 del ciclo celular; 2) inhibición de la ODC y síntesis de PA; 3) al sistema calcio-calmodulina; 4) aumento del adenilato ciclasa ß-adrenérgico; 5) inhibición del receptor de prolactina, disminución en la expresión de transferrina y receptores del factor de crecimiento epidermial (EGF); 6) inhibición del "factor de elongación 2" de biosíntesis de proteínas; 7) interferencia con fosfolipasa A, actividad y metabolismo eicosanoide y 8) inhibición de la transcripción de los oncogenes (Kanitakis & Thivolet, 1990).

Acerca de todo ello, se ha demostrado que la CsA detiene las líneas sensibles de células T en la fase G_0 ó G_1 del ciclo celular (Koponen et al, 1982). Aunque evidencia directa del mismo efecto sobre queratinocitos de epidermis (QCEs) no se conoce hasta el momento, el hallazgo de un número reducido de QCEs en fase S tanto in vivo (Urabe et al, 1989), como in vitro (Ramirez-Bosca et al, 1990a), bajo tratamiento con CsA, sugiere que los QCs son retrasados ó detenidos en una primera fase (G_0/G_1) del ciclo celular. Esto podría justificar el efecto beneficioso en QCEs psoriaticos, en los que el ciclo celular es acortado en longitud (Weinstein et al, 1985).

Varias señales mitogénicas inducen la actividad de la ODC y creciente síntesis de PA, putrescina, espermina y espermidina. Esta etapa se piensa que es un requisito previo para el subsiguiente aumento de la síntesis de proteínas, ADN y ARN que ocurren durante la proliferación celular (Pegg & Cann, 1982). La CsA inhibe la inducción de la ODC en los linfocitos provocada por los mitógenos, los antígenos, las linfoquinas (IL-1 y IL-2) (Floelius et al, 1984) y la prolactina (Russel et al, 1984), así como la inducida por ésteres del forbol (Gschwendt et al, 1985) y la expresión mARN de la ODC en la epidermis del ratón (Elder et al, 1988). In vitro, la CsA disminuye la síntesis de PA en líneas celulares de adenocarcinoma de colon de ratón y carcinomas de páncreas de hamster (Kanitakis & Thivolet, 1990). La actividad antiproliferativa de la CsA en estos casos, se intensificó notablemente por inhibidores clásicos de la ODC, tal como el α-difluorometilornitina (Saydjari et al, 1986a), (Saydjari et al, 1986b). La inducción de la ODC y el incremento de la síntesis de PA son hechos que ocurren en los QCs

psoriáticos (Lowe et al, 1982) (Boucli r et al, 1986), por lo que inhibidores de la ODC, aplicados tópicamente, se ha probado que son efectivos, aunque moderadamente, en el tratamiento del psoriasis (Grosshans et al, 1980).

El aumento brusco de la concentración de Ca^{++} intracitoplasmático provoca la activación alostérica de la CaM y la puesta en marcha de una cascada de reacciones de activación enzimática, que incluye a los sistemas dependientes de adenilato y guanilato ciclasa, adenosin-monofosfato fosfodiesterasa, ODC y diversas fosfoquinasas, involucrados en respuestas celulares proliferativas (Kanitakis & Thivolet, 1990). A nivel de los linfocitos T se ha demostrado que la CsA se une a la CaM, previniendo esta unión la activación de los enzimas que se requieren para una efectiva proliferación celular (Colombani et al, 1985). La sensibilidad específica de una célula dada a la acción de la CsA, está probablemente vinculada a la concentración intracelular de otras proteínas susceptibles de fijar dicho fármaco, tales como la CYP (Handschumacher et al, 1984) (Harding & Handschumacher, 1988). De acuerdo con esta atractiva hipótesis, la CYP y presumiblemente otras proteínas citosólicas (Foxwell et al, 1988) que se unen a la CsA, prevendrían la capacidad de esta droga para inhibir la CaM (Hess & Colombani, 1988).

Un aumento en la actividad intracelular de la CaM se ha detectado en QCEs del psoriasis (Van Erp & Van de Kerkhof, 1987), por lo que inhibidores de la CaM (clorpromacina) administrados localmente (Humbert et al, 1986) ó de forma sistémica (Fandeev et al, 1961), se ha probado que son beneficiosos en el tratamiento del psoriasis. Sin embargo, la hipótesis basada en el equilibrio entre CaM y otras proteinas que se unen a la CsA, aunque suficiente para explicar la existencia de subpoblaciones de células T sensibles y resistentes a la CsA (células T-ayudantes y T-supresoras respectivamente), no es totalmente satisfactoria para explicar los efectos opuestos (proliferativo versus antiproliferativo) sobre QCEs de los folículos pilosos y de la epidermis interfolicular. La CsA, a pesar de disminuir in vitro el número de QCEs, no influye ni en la bioactividad ni en la reacción inmunológica de la CaM en los QCEs (Fairley et al, 1989).

El siguiente dato a considerar es el efecto inmediato que la CsA tiene sobre el Ca^{++} al aumentarlo en las mitocondrias (Richter et al, 1990) y en el citoplasma celular (Nicchitta et al, 1985) (Meyer-Lehnert & Schier, 1988); de igual manera, la CsA reduce el flujo a traves de la Ca^{++}/Na^{+} ATPasa (Kimball & Sell, 1989), con lo que el Ca^{++} intracelular aumenta mucho más, provocando un reclutamiento de la bomba Ca^{++}/Na^{+}, que tiene dificultada su función por el tercer efecto de la CsA sobre bombas iónicas, como es la inhibición de la bomba Na^{+}/H^{+} (Rosoff & Terres, 1986) (Daniel & Ives, 1987), incrementando el Na^{+} intracelular. Todos estos desequilibrios conducen a unas concentraciones iónicas no permisivas de los primeros pasos de la activación celular, inhibiendo el paso de G_0 a G_1 (Gelfand et al, 1987) (Kimball et al, 1988) posiblemente

a través de un bloqueo de la síntesis de PAs y de la actividad ODC. Todas estas oscuras fases terminan por interferir con la carga genética, la cual dependiendo del tipo de célula, sea ésta normal o tumoral, se expresará con diferentes productos ya intermediarios o finales, como factores de crecimiento y proliferación, ó factores de diferenciación, que serían la contrapartida a los primeros. Por ejemplo, a nivel de QCs, un aumento del Ca^{++} intracelular (Suter et al, 1991) estimula la diferenciación con la producción de sustancias precursoras de la capa cornea (integrinas, involucrinas, queratinas, etc) (Marchisio et al, 1991) (Rorke & Eckert, 1991) (Rosenthal et al, 1991), fibronectina (Nicholson & Watt, 1991), interleuquinas como la IL-1, IL-6, IL-8, y otras que tienen verdadero efecto inductor y regulador de fibroblastos (Kristensen et al, 1991), colágeno de tipo IV y VII (Konig & Bruckner-Tuderman, 1991), etc.. Todos estos fenómenos de inducción podrían explicar algunos de los hechos fisiopatológicos, principalmente fibrosis incrementada, encontrados en nefrotoxicidad y en la hiperplasia gingival inducida por la CsA (Wysocky et al, 1983).

De todo lo anterior puede deducirse que, la interacción y posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre la CsA y los antagonistas del calcio, de cara a prevenir o acentuar la nefrotoxicidad ó el desarrollo de hiperplasia gingival, así como el posible control que ambos tipos de drogas realizan sobre el crecimiento y activación de diversas poblaciones celulares normales y neoplásicas, está completamente abierto a discusión, puesto que los trabajos experimentales y clínicos discrepan profundamente.

La ciclosporina H no inmunosupresora, que puede no obstante inhibir el desarrollo de QCEs, no bloquea el aumento inducido por fitohemaglutinina en la concentración intracelular de Ca^{++} de los linfocitos T. Este hallazgo, si se probara su validez para QCEs, implicaría que la acción antiproliferativa de las ciclosporinas sobre QCEs probablemente no depende del aflujo de Ca^{++} (Kanitakis & Thivolet, 1990).

La CsA también ha demostrado acción bloqueante sobre los receptores celulares de prolactina e inhibe la actividad ODC estimulada por prolactina en el riñón, hígado, bazo, timo, corazón, glándula adrenal y aorta (Russel et al, 1984). De aquí que el bloqueo específico del receptor de prolactina del linfocito, se ha postulado como un posible mecanismo de la actividad inmunosupresora de la CsA. No se conocen receptores de prolactina en los QCEs ni en la mayoría de las células tumorales (Russel et al, 1984); sin embargo, la elevada naturaleza lipídica de la CsA, le hace posible entrar en la célula por difusión a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática.

En los linfocitos T, la CsA puede prevenir la aparición de antígenos activados de

superficie celular, tal como receptores de transferrina (Leapman et al, 1982) (Miyawaki et al, 1983). Se ha estudiado la expresión de varios antígenos asociados a proliferación ó activación de QCEs (incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, receptores de transferrina y antígenos HLA-DR) ó piel humana que ha sido xenotrasplantada sobre ratones desnudos tratados con CsA; y no se han observado diferencias significativas entre especímenes tratados con CsA y control (Kanitakis et al, 1989).

Kato y colaboradores (1988) comprobaron que la CsA aumenta el componente intracelular adenosin monofosfato cíclico después de la estimulación con epinefrina; mientras que la actividad del adenosin monofosfato fosfodiesterasa cíclico no se vió afectada. Ellos concluyeron con que, a la dosis usada (de 1 a $0{,}4 \times 10^{-3}$ g/l), la CsA aumenta la respuesta del adenilato ciclasa ß-adrenérgico en la epidermis. Este estudio fué sugerido por el hecho de que en una epidermis psoriática, la respuesta del adenilato ciclasa ß-adrenérgico se encuentra disminuida y que agentes capaces de aumentar esta respuesta (como la hidrocortisona) son efectivos en el tratamiento del psoriasis.

Mas recientemente, Mitra y colaboradores (1989) estudian la modulación del factor de crecimiento epidérmico marcado con iodo 125 unido a QCEs humanos normales en cultivo, observando que la CsA (en el rango de concentraciones de 2,5 a 10×10^{-3} g/l) reduce el número de lugares de unión del factor de crecimiento transformado ß y gamma interferon, aproximadamente del 40% al 50% en comparación con células no tratadas. Esto sugiere un efecto antiproliferativo unificado de estas moléculas sobre QCEs y podría explicar también el efecto de la CsA en el psoriasis, ya que se produce una sobreexpresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico en la epidermis lesionada por esta enfermedad (Nanney et al, 1986). Además, la CsA puede inhibir in vitro el factor de crecimiento básico de fibroblastos dirigido a QCEs y células endoteliales (Sharpe et al, 1989). Puesto que la señal mitogénica del factor básico de crecimiento de fibroblasto se inicia a través de un receptor de membrana, que es diferente del factor de crecimiento del receptor epidérmico, la posibilidad de que la CsA pueda interactuar con más de un tipo de moléculas de la membrana no puede ser excluida.

La CsA puede inhibir algunos efectos biológicos originados por ésteres del forbol que son promotores tumorales (12-tetradecanoil-forbol-13 acetato,TPA), no solamente sobre células linfoides sino también sobre células epiteliales. Aplicada tópicamente sobre piel de ratón, la CsA suprime la síntesis de ADN inducida por TPA, la activación de ODC, la producción de ácido 8-hidroxieicosatetraenoico, la actividad alcalino fosfatasa (Gschwendt et al, 1985) así como la producción de mARN IL-1a (Elder et al, 1988). Estos efectos están relacionados probablemente con la inhibición producida por la CsA de la fosforilación dependiente de la CaM, de una

proteina citosólica (Gschwendt et al, 1987) que ha sido identificada recientemente como "factor de elongación 2" de biosíntesis de proteínas (Gschwendt et al, 1988). En todo caso, el hallazgo de que la CsA no inhibe la actividad de la protein-Kinasa C soluble, que es el receptor intracelular de ésteres del forbol, sugiere que el paso en la vía de activación celular inhibida se encuentra distante de la estimulación de la protein-Kinasa (Elder et al, 1988). A este respecto, los isómeros inmunológicamente inactivos, ciclosporinas H y D, parecen capaces sin embargo de inhibir los efectos biológicos antes mencionados sobre piel de ratón inducidos por TPA (Elder et al, 1988) (Gschwendt et al, 1988).

La CsA inhibe la actividad fosfolipasa A2 de membrana (Fan & Lewis, 1985) provocando depleción de algunas prostaglandinas (Stahl & Kudelka, 1986), y elevación de los niveles intersticiales y séricos de tromboxano A2 (Brown et al, 1990).

Estos resultados sugieren que la CsA parece ser capaz de interferir con el metabolismo eicosanoide en ciertos tipos de células. Sin embargo. el impacto de esta interferencia sobre la proliferación de QCEs aguarda una mayor clarificación.

En linfocitos de sangre periférica estimulados por fitohemaglutinina, dosis relativamente bajas de CsA (10^{-3}g/l) suprimieron la expresión del mARN de los oncogenes c-myc, N-ras y en menor grado c-fos (Reed et al, 1985). Similarmente, en los timocitos, la CsA suprime la expresión mARN de c-myc estimulando con concanavalin A y concanavalin A mas TPA. Evidencia de una acción similar sobre células epiteliales no existe actualmente. Sin embargo es interesante hacer notar que en las lesiones psoriáticas existe una sobreexpresión de los oncogenes K-ras, myc, fos y abl (Mordovtsev et al, 1988).

I-1.5.- EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA CsA

I-1.5.1.- Estudio in vitro.

Datos experimentales recientes sugieren que la CsA es capaz de ejercer una acción antiproliferativa sobre líneas celulares no linfoides, tales como fibroblastos y células epiteliales y endoteliales, y muestran que el efecto de la CsA sobre células no linfoides puede ser directo y no relacionado con una (especulativa) interacción con linfocitos (Ramirez-Bosca et al, 1990b).

La mayoría de los estudios que conciernen al efecto de la CsA sobre la proliferación de QCs, han demostrado una inhibición del crecimiento evaluada tanto por contaje del número total de células viables al final del cultivo (Nickoloff et al, 1988) (Sharpe et al, 1989), como por medio

del tiempo de doblaje y densidad de saturación del cultivo empleando timidina tritiada y 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) (Furue et al, 1988) (Sharpe et al, 1989). La inhibición del crecimiento se produce en torno a dosis de 0.1×10^{-3} g/l. En estos experimentos, la CsA disminuyó el número total de QCEs después de 48 a 96 horas de cultivo, así como la síntesis de ADN y el porcentaje QCEs en fase S. Células epiteliales que han mostrado ser sensibles a la CsA, aparte de los QCEs normales humanos (Nickoloff et al, 1988) y murinos (Furue et al, 1988), son los carcinomas de células escamosas (líneas A431 y SK Mel-1) (Lucia et al, 1986) (Furue et al, 1988) (Sharpe et al, 1989), el carcinoma de células pequeñas de pulmón (línea NCIH69) (Twentyman, 1988a)), líneas celulares de ratón transformadas espontáneamente (Pam 212) (Furue et al, 1988), células de islotes pancreáticos de ratón y hamster (línea H2T) (Andersson et al, 1984) (Saydjari et al, 1986a) y células de adenocarcinoma de colon (línea MC) (SAyJjari et al, 1986b). En estas líneas celulares, el efecto de la CsA se traduce en la aparición de distintos marcadores de diferenciación celular: Queratinas tipo I y II, filagrinas, integrinas, selectinas y otra moléculas de adherencia celular (Marchisio et al, 1990) (Steven et al, 1990) (Marchisio et al, 1991) (Nicholson & Watt, 1991).

Además del efecto descrito sobre células epiteliales, la CsA ejerce in vitro una detención del crecimiento de varias líneas celulares no linfoides (Kanitakis & Thivolet, 1990).

Este efecto semejante frente a un gran número de líneas celulares de distintos orígenes, todas ellas exentas de componente linfoide asociado, sugiere que la actividad de la CsA va mas allá de la mera acción mediada por linfoquinas (Dykes et al, 1989).

I-1.5.2.- Estudio in vivo.

Con el fin de valorar in vivo la posible actividad antiproliferativa directa de la CsA, Ramirez-Bosca y colaboradores (1990b) evaluaron la proporción de células epiteliales de piel, lengua y esófago en fase S mediante la incorporación de BrdU, en ratones congénitamente atímicos (Urabe et al, 1989) soportando trasplante de piel humana y recibiendo una inyección subcutánea diaria de 50 mg/Kg de CsA durante tres semanas. Comparados con los animales controles, los ratones tratados mostraron un índice de marcaje (BrdU) disminuido en todos los tejidos epiteliales estudiados, lo cual fué estadísticamente significativo en el caso de la epidermis, tanto humana como de ratón (Kanitakis et al, 1990), y la lengua. Estos resultados sugieren que la CsA también ejerce una actividad antiproliferativa, inmunológicamente independiente, sobre las células epiteliales in vivo. La duración del estudio (3 semanas) fué determinada sobre la observación de que en este periodo de tiempo se desarrolló una hipertricosis generalizada sobre el cuerpo de animales tratados, un hecho que prueba que la CsA había alcanzado efectivamente

la piel y producido su mejor conocido y macroscópicamente visible efecto farmacológico (Kanitakis et al, 1988) (Urabe et al, 1988). El efecto antiproliferativo de la CsA sobre tejidos epiteliales normales in vivo, sugiere que un efecto similar podría darse en células hiperproliferativas, neoplasias benignas ó malignas. Como se mencionó anteriormente, esta actividad ha sido ya demostrada in vitro para líneas celulares neoplásicas. In vivo, a pesar de la inmunosupresión que generalmente favorece el crecimiento tumoral, se ha observado que ratones inoculados con la línea EO-771 de adenocarcinoma, mostraron en comparación con animales control, mejor supervivencia cuando se trataron con 50 a 100 mg/Kg de CsA (Kreis & Soricelli, 1979).

Por otra parte, estudios sobre los efectos antiproliferativos de la CsA in vivo, han descrito la efectividad del fármaco en el control del psoriasis (Weinstein & Frost, 1968) (Ellis et al, 1986) (Khandke et al, 1991) e ictiosis vulgar (Velthuis & Jesserun, 1985) y, aunque el seguimiento de los pacientes inmunodeprimidos es corto, existen datos muy sugerentes, cuando se compara la inmunosupresión convencional (azatioprina + prednisona) frente a los pacientes tratados con CsA, acerca de una menor incidencia de carcinoma de piel, cervix uterino, vulva y peritoneo (Penn & First, 1986) (Penn, 1987).

La modulación que ejerce la CsA sobre quimioterápicos de uso clínico, en particular los del grupo de la antraciclina (Twentyman, 1988a), adriamicina, vincristina (Kanitakis & Thivolet, 1990) y doxorubicina, devolviendo la sensibilidad de las células neoplásicas a dichas drogas, abre un campo de experimentación para los tumores sólidos resistentes a la quimioterapia convencional.

I-1.5.3 - Análogos de la CsA.

Hasta ahora, al menos 46 análogos naturales ó semisintéticos de la CsA han sido descritos (Von Wartburg & Traber, 1986). Estudios farmacológicos han demostrado que cambios en la molécula nativa (tales como desmetilación), hacen disminuir ó desaparecer la actividad inmunosupresora (Wenger, 1986).

No existen datos que relacionen la estructura molecular de la CsA y su actividad citostática sobre células epiteliales. Sin embargo, estudios in vitro han demostrado que análogos de la CsA que han perdido total o parcialmente la actividad inmunosupresora, todavía retienen un efecto citostático, tal es el caso de la ciclosporina H (Nickoloff et al, 1988) (Ramirez-Bosca et al, 1989) isómero inactivo, que ejerce un efecto antiproliferativo sobre el crecimiento de QCEs normales en cultivo. Por otra parte, isómeros inmunológicamente inactivos, se comportan como

moduladores de la quimioresistencia al igual que la CsA o incluso mejor que ella (Twentyman, 1987) (Twentyman, 1988a).

Por todo lo anteriormente expuesto, este campo de investigación es prometedor puesto que en un futuro, el uso clínico como agentes antiproliferativos de ciclosporinas no inmunosupresoras asociadas o no a otros agentes farmacológicos, podrá estar indicado para el tratamiento de enfermedades en que se encuentre incrementada la tasa de proliferación celular, como es el caso de las neoplasias (Twentyman, 1988b).

I-1.6.- METODOS PARA LA DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CsA Y SUS METABOLITOS.

La monitorización de la CsA está justificada por la gran variabilidad en los niveles del fármaco entre pacientes y en mismo paciente en la absorción oral y porque es conveniente mantener niveles de CsA en rango terapéutico, para evitar el rechazo y minimizar los posibles efectos adversos (Morales y Andrés, 1991). Fundamentalmente los niveles de CsA pueden ser de gran ayuda para distinguir el rechazo de la nefrotoxicidad por CsA. Así, en caso de deterioro de la función renal, la presencia de niveles elevados de CsA apoyaría mas la existencia de nefrotoxicidad y los niveles bajos sustentarían la presencia de rechazo agudo. El problema es que no existe una total correlación entre estos diagnósticos y los niveles de CsA, por lo cual, siempre se deben de interpretar los niveles de CsA como un dato más dentro del contexto clínico junto con otros datos bioquímicos e histológicos del paciente, mas que como un dato absolutamente fundamental (Morales y Andrés, 1991).

El uso de diferentes sistemas de ensayo para medir niveles en sangre de CsA es un tema muy discutido (Shaw et al, 1987). Los métodos de laboratorio hoy día mas eficaces para medir CsA son: La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Maurer, 1985) (Rosano et al, 1986) y el radioinmunoanálisis (RIA) (Donatsch et al, 1981) (Shaw, 1989). Mientras que el HPLC permite la determinación de la CsA, el RIA mide a la vez CsA y metabolitos, puesto que el antisuero de oveja contra CsA también reconoce algunos metabolitos. Como las reacciones son muy variables, ensayos usando diferentes anticuerpos policlonales dan diferentes resultados (Shaw, 1989). Con el hallazgo de anticuerpos monoclonales frente a CsA, ha sido posible seleccionar dos anticuerpos, uno que reconoce casi exclusivamente CsA y otro que no distingue entre CsA y la mayor parte de los metabolitos (Quesniaux et al, 1987b). No obstante, la cuantificación de los diferentes metabolitos tiene que ser hecha mediante la técnica de HPLC (Ryffel et al, 1988).

No está claro cual es el método de ensayo y fluido biológico mas apropiado para

monitorizar CsA (Yee et al, 1988). La concentración de CsA puede ser medida en suero (Keown & Stiller, 1988), plasma ó sangre total , prefiriendo la mayoría de los autores la determinación en este último fluido (Wenk et al, 1983) (Faynor et al, 1984) (Burckle, 1985). La mayoría de los participantes al Congreso Internacional de CsA (1988) monitorizaron la terapia con CsA mediante uno de los tres métodos siguientes: 1º) concentraciones de CsA en plasma medidas por RIA, 2º) concentraciones de CsA en sangre total medidas por HPLC y 3º) concentraciones de CsA en sangre total medidas por RIA. Los proponentes de plasma argumentaron que, éste transporta la CsA y sus metabolitos al tejido periférico y proporciona por tanto el índice mas preciso de la concentración de la droga y sus metabolitos en tejidos periféricos. Los proponentes de sangre total (Faynor et al, 1984) argumentaron que, puesto que la distribución de CsA entre los hematies y plasma varía con la temperatura, las mediciones en sangre no dependen de las condiciones de procesar la muestra tales como la temperatura y que, la CsA y sus metabolitos, tienen una afinidad mayor para la fracción celular de la sangre. Cambios en las concentraciones de CsA y de sus metabolitos en sangre, reflejarían por tanto cambios en las concentraciones de tejidos diana (Yee et al, 1988).

Huang y colaboradores (1987) han analizado y comparado las concentraciones de CsA, en especímenes de sangre total de pacientes pediátricos con trasplante renal, usando tres métodos diferentes: HPLC, ^{3}H RIA y ^{125}I RIA. Ellos observaron que las curvas estándar de CsA por los métodos ^{125}I RIA y ^{3}H RIA, eran paralelas. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en plasma (Ryffel et al, 1983). Por otro lado, encontraron una relativamente pobre correlación entre los métodos ^{3}H RIA y HPLC y entre los métodos ^{125}I RIA y HPLC. Ambos resultados RIA fueron mas elevados que los resultados HPLC, siendo las concentraciones de CsA generalmente mas altas por el método ^{125}I RIA que por el método ^{3}H RIA.

Es importante recordar que cada laboratorio individual debería establecer sus propios rangos terapéuticos para niveles de CsA de monitorizados. Así, cuando se usa como patrón ^{125}I en lugar del patrón ^{3}H, el rango terapéutico debería ser mas alto porque el método ^{125}I RIA conduce a un valor mas elevado de concentración de CsA que el ^{3}H RIA (Huang et al, 1987).

El uso de ^{125}I RIA proporciona un método mas fácil y rápido, con eficiencia de contaje mayor, así como mas sensible y menos background que el método ^{3}H RIA (Mahoney & Orf, 1985). Esto, junto a la alta recuperación y reproductibilidad del ^{125}I RIA para CsA y la buena correlación (r=0,95) entre ^{3}H RIA y ^{125}I RIA, indicó que el RIA marcado con ^{3}H puede ser reemplazado por el RIA marcado con ^{125}I para determinaciones de CsA.

Keown y Stiller (1988) utilizan la medición con RIA para la monitorización clínica

rutinaria y la técnica de HPLC la aplican a pacientes con alteraciones en la función hepática. Si la función hepática es normal, el cociente fármaco original/compuesto inmunorreactivo total es de aproximadamente el 70% en el pico de concentración del farmaco y del 30 al 40% para concentraciones medias. En los casos de disfunción hepática, este cociente puede disminuir a menos del 10%, por lo que es necesario monitorizar, utilizando HPLC, para determinar si el nivel del compuesto original es lo suficientemente elevado para poder conseguir un nivel adecuado de inmunosupresión (Keown & Stiller, 1988).

Por otro lado, se ha visto que el desarrollo de nefrotoxicidad está correlacionado con la dosis de CsA y niveles en plasma medidos por RIA (Mihatsch et al, 1982) (Holt et al, 1985), pero no con niveles en plasma determinados por HPLC (Yee et al, 1986) (Yee et al, 1988). Este y otros descubrimientos sugieren que los metabolitos, mejor que el componente madre, podrían ser responsables de la nefrotoxicidad (Ryffel et al, 1988). Por tanto, ha sido sugerido que el RIA es el método de elección para monitorizar CsA si lo que queremos evaluar es toxicidad.

Los valores en rango terapéutico de CsA determinados por HPLC oscilan entre 100 y 450 ng/ml (Ptachcinski et al, 1985). Los valores en sangre total con el RIA monoclonal especifico oscilan entre 150 y 400 ng/ml (Keown, 1988). Ambos métodos producen resultados cuantitativos y reproducibles de la droga sobre sangre total (Abbot & Pippenger, 1985).

I–2.- ENSAYOS PRECLINICOS CON QUIMIOTERAPICOS ANTINEOPLASICOS.

I–2.1.- MODELOS EXPERIMENTALES IN VITRO.

Una de las aproximaciones al desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos está basada en parte, en el screening inicial de compuestos químicos sobre células tumorales humanas, murinas ó de otras especies animales in vitro.

La evolución y difusión de los sistemas experimentales para la testificación de diferentes sustancias, guarda por tanto, una estrecha relación con el advenimiento y sistematización de las técnicas de cultivo de tejidos, sobre todo, tras demostrarse que los tumores humanos podían dar origen a líneas celulares permanentes (Gey et al, 1952).

Las técnicas de cultivos celulares tienen múltiples aplicaciones tanto en el área de las ciencias médicas como en otras áreas científicas relacionadas con la Biología, siendo un ejemplo típico de reduccionismo aplicado a los estudios de quimiosensibilidad. La imposibilidad de

obtener respuestas últimas de causalidad con la utilización de modelos animales, dirigió a los investigadores a la parcelación de las preguntas usando la propiedad de ciertas células de crecer "in vitro", cuando son mantenidas en un arbitrario conjunto de nutrientes (Olea y cols., 1991).

Las ventajas fundamentales de los cultivos celulares sobre la utilizacion de animales de experimentación (Hsu, 1977) (Freshney, 1983), en la determinación experimental de quimiosensibilidad son:

1) Los cultivos celulares proveen una fuente inagotable de material, de forma que las células pueden ser almacenadas en condiciones especiales, sin que al recuperarlas hayan cambiado ni sus cualidades proliferativas ni su composición genética. Asimismo, su característica principal es la homogeneidad, lo cual posibilita la caracterización de la muestra celular empleada.
2) Las células "in vitro" pueden manipularse como no es posible hacer con poblaciones "in vivo", pues permite el control físico-químico del medio de cultivo y de las sustancias cuya acción se investiga.
3) Facilitan la reproductibilidad de los experimentos.
4) Suponen una gran economía en tiempo y dinero.
5) En un momento en donde la conservación de la vida es algo trascendente, la utilización de los cultivos celulares ahorra muchas vidas animales.

Sin embargo, junto a estas ventajas objetivas existen ciertos inconvenientes o dificultades. Así, es obvio el hecho de que las técnicas de cultivos celulares son complejas y exigentes, en cuanto a que requieren unas condiciones estrictas de manipulación para evitar tanto contaminaciones intracultivo (contaminaciones microbianas), como intercultivos. En segundo lugar, hay que destacar la natural inestabilidad de los subcultivos. En este sentido, se sabe que los subcultivos tempranos de células mantienen sus características geno y fenotípicas en equilibrio de continuidad inestable. Este estado de equilibrio puede cambiar en pases tardíos, ocasionando la consiguiente alteración de la homogeneidad y perturbando la reproductibilidad del análisis. Finalmente, es conocido que no es posible predecir primero la cantidad de material procedente de un tumor necesaria para cultivar sus células, e investigar después, sus características de quimiosensibilidad (Gorgojo y cols., 1991).

El desarrollo de pruebas predictivas "in vitro" capaces de ofrecer elementos para la individualización de la quimioterapia del cáncer, se inicia en la década de los cincuenta, cuando Black y Speer (1954), estudiando sobre cortes de tejido tumoral, la inhibición de la actividad total de las deshidrogenasas intracelulares producidas por agentes alquilantes, encontraron la existencia de cierto nivel de relación entre este parámetro bioquímico y la respuesta clínica del paciente a

la terapia farmacológica. A partir de ese momento, se han descrito múltiples ensayos encaminados a predecir la respuesta "in vivo" del tumor, tras el ensayo "in vitro" de actividad(es) de fármacos sobre células extraídas previamente de la propia neoplasia.

La evaluación de los ensayos de quimiosensibilidad debe cubrir los siguientes objetivos:
-La predicción de la respuesta clínica al tratamiento farmacológico en los tumores humanos (Bertoncello et al, 1982) (Durie et al, 1983) (Jones et al, 1984) (Alley & Lieber, 1985).
-La investigación de la actividad antineoplásica de nuevas drogas (Isell et al, 1984) (Ludwing et al, 1984) (Shoemaker et al, 1984).
-El empleo de criterios farmacológicos para la fijación y el cálculo de la dosis de fármaco que deben ser utilizadas en los ensayos "in vitro".
-El estudio de los mecanismos de dependencia de la acción antitumoral de la droga, respecto a la pauta seguida en su utilización.
-La identificación de aquellas combinaciones de fármacos cuyos efectos antitumorales resultan aditivos (o sinérgicos).
-La estandarización de los sistemas enzimáticos necesarios, para aquellas sustancias que precisan de transformaciones metabólicas en su proceso de bioactivación (Alberts et al, 1981).

No obstante, con pocas excepciones notables, la respuesta de los tumores sólidos humanos frente a drogas, no se correlaciona del todo con el efecto in vitro. En consecuencia, las técnicas ensayadas no han sido sistemáticamente aceptadas como tests predictivos, generándose un considerable escepticismo frente a tales modelos y existiendo una clara heterogeneidad entre las observaciones publicadas por los distintos autores (Alberts et al, 1980) (Von Hoff et al, 1981) (Mann et al, 1982) (Benard et al, 1983). Este hecho parece deberse por una parte a los numerosos problemas asociados con la biología de los tumores sólidos "in vivo" (p.e., barreras a la penetración de la droga, gradientes de proliferación, y condiciones medioambientales), y por otra a la desventaja intrínseca que supone la incapacidad para reconocer los componentes que requieren activación metabólica sistémica, así como a la modificación desigual de algunas de las propiedades básicas de las células tumorales al ser estudiadas "in vitro" (Hamburger, 1981) (Chabner, 1990) (Philips et al, 1990).

Las tres propiedades celulares que sufren mayores modificaciones y que están sujetas a más amplia variabilidad, dependientes, quizás, del cultivo y del método, son (Gorgojo y cols, 1991):

1) La dinámica de reparación de lesiones potencialmente letales en las células cultivadas y tratadas "in vitro".
2) La cinética de crecimiento celular.
3) La eficacia del clonaje.

Estas tendencias de modificación de parámetros no son generales y suelen mantener constantes "in vitro", gran número de las características celulares que pueden ser definidas "in vivo" (Alberts et al, 1980) (Von Hoff et al, 1981). Así, es destacable la estabilidad de variables como la morfología celular, la tumorogenicidad, la histología ó la expresión de biomarcadores, y su equivalencia "in vivo" e "in vitro" (Gaznard et al, 1980) (Tveit et al, 1981).

Los ensayos y test in vitro diseñados por los diferentes grupos de investigadores pueden ser agrupados en seis categorías (Carney & Winkler, 1985) : 1.- Evaluación morfológica del daño de la monocapa celular ó en cultivo de órganos (Wheeler et al, 1974). 2.- Medida de la inhibición del metabolismo celular (DiPaolo & Dowd, 1961). 3.- Medición in vitro de la inhibición de la incorporación de precursores radiactivos (Block et al, 1984) (Daidone et al, 1985) (Sondak et al, 1985). 4.- Estimación de la fracción clonogénica en el seno de la población tumoral (Von Hoff et al, 1983) (Alley & Lieber, 1985). 5.- Estimación bioquímica de la captación del fármaco ó de los metabolitos generados tras su biotransformación. 6.-Detección del fenotipo celular de multirresistencia a fármacos (Gerlach et al, 1987) (Goldstein et al, 1989) (Chabner & Gottesman, 1990).

I-2.1.1.- Evaluación morfológica del daño celular inducido por fármacos en monocapa ó cultivo de órganos.

El trabajo de Wright y colaboradores en la década de los cincuenta (Wright et al, 1957) trazó las líneas maestras de actuación, que posteriormente han seguido otros investigadores, para la evaluación de agentes quimioterápicos en cultivo de tejidos, establecida simplemente bajo visión microscópica. Las primeras informaciones comunicadas por dicho grupo, fueron bastante alentadoras, ya que demostraron una correlación significativa, entre la sensibilidad del tumor in vitro y el subsiguiente curso clínico en 26 de 40 pacientes testificados. Este hecho dió motivos para considerarlo como un método valorable no sólo para la selección del agente terapéutico más efectivo, sino también como método de laboratorio para screening de agentes con actividad antitumoral (Wright et al, 1957).

No obstante, posteriores resultados del mismo grupo fueron menos alentadores (Plummer-Cobb et al, 1961) (Wright et al, 1962), observándose diferente respuesta en distintas

muestras del mismo tumor y discrepancias entre el efecto in vitro e in vivo en 45 de los casos.

Con posterioridad, la evaluación morfológica ha sido empleada como forma básica de aproximación al estudio del efecto de numerosos fármacos, bien sobre explantes de tejidos (McDonald et al, 1963) (Hurley & Yount, 1965) ó sobre cultivos de órganos (Yarnell et al, 1964) en cortos períodos de tiempo. Más recientemente, este método evaluador ha sido empleado por otros autores demostrando correlación clínica positiva (Holmes & Littie, 1974) (Lickiss et al, 1974).

El desarrollo de esta modalidad de ensayos también ha sido activamente propuesto por Dendy y colaboradores sobre cultivos en monocapa para un amplio espectro de quimioterápicos (Wheeler et al, 1974), que reconociendo la aleatoriedad que supone una medición tan subjetiva, incorporan métodos cuantitativos (incorporación de timidina, autorradiografía o el contaje celular). De sus experiencias se concluye que los pacientes tratados de acuerdo con los resultados de los test in vitro, consiguieron supervivencias más prolongadas que los tratados con protocolos estándar.

Entre las objeciones que se aducen con relación a esta técnica se encuentran la dificultad de establecer la concentración adecuada del fármaco y un tiempo de exposición que se ajuste a la realidad, así como la imposibilidad de cuantificar los resultados. Respondiendo a estas objeciones, puede decirse que la mayor parte de los quimioterápicos utilizados en Oncología Clínica, alcanzan su máxima concentración tisular en el curso de la primera hora, tras su administración (Alberts et al, 1981) (Calabresi & Chabner, 1991). Este hecho ha llevado a la mayor parte de los autores a fijar el tiempo de exposición. Algunos datos referentes a la evaluación "in vitro" de las drogas, indican que: 1º) La magnitud de sensibilidad a la droga medida en una línea celular dada, depende primariamente de la duración del cultivo y, 2º) que un rango de siembra de células causa un crecimiento óptimo ó cerca del óptimo para cada línea celular dada y similares perfiles de sensibilidad a drogas. El concepto que permite fijar "in vitro" el nivel de concentración de droga adecuado al ensayo, deriva de la máxima concentración plasmática que es posible alcanzar "in vivo". En este sentido, Alberts y colaboradores (1981) han propuesto que el rango de concentracion del agente quimioterapéutico ensayado se establezca en torno a un valor situado entre el 5-10% del pico de máxima concentración plasmática alcanzada. Para solventar el último inconveniente, se han introducido las tinciones con colorantes vitales (azul tripán, eosina, etc.), para cuantificar el número de células (Durkin et al, 1979).

I-2.1.2.- Test in vitro para la medición de la inhibición del metabolismo celular.

Este test consiste en la medición del daño inducido por fármacos mediante la inhibición del metabolismo celular, en particular la inhibición de la actividad deshidrogenasa basada en que las sales de tetrazolio (E_0'= -110mV) y entre ellas el MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolium bromida) (SIGMA) son fácilmente reducidas por algunos coenzimas tales como NADH y NADPH (E'= -317mV) y también por otros sustratos reductores entre los que se incluyen diversas deshidrogenasas, originando productos coloreados MTT formazán derivados, y que esta reacción puede ser cuantificada espectrofotométricamente.
Estudios iniciales (Slater et al, 1963) con el sistema succinato deshidrogenasa en homogeneizados de hígado de rata indicaban que el MTT es reducido por la ubiquinona, citocromo-b y en los lugares c de la cadena transportadora de electrones por la adhesión de sus anillos a la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, ésta no es una evidencia sustancial para aseverar que la reducción del MTT esté exclusivamente confinada a la mitocondria activa. El hecho de que las sales de tetrazolio son ampliamente utilizadas en histoquímica para la demostración de enzimas específicos no-mitocondriales, sugiere que la reducción del MTT puede ocurrir en multiples sitios de la célula. (Vistica et al, 1991).

Las sales de tetrazolio se encuentran entre las últimas generaciones de colorantes empleados para facilitar la detección de colonias y para discriminar entre los grupos de células viables-no viables en cultivos celulares tratados con fármacos. Desde los primeros ensayos de medida de la viabilidad celular se dejó bien establecido que las sales de tetrazolio son adheridas y reducidas por todas las células metabólicamente activas, pero no por células muertas o eritrocitos (Mosmann,1983), así como que la cantidad de formazán generado es directamente proporcional a la cantidad de sales de tetrazolio añadidas y al número de células viables sobre un amplio rango usando poblaciones celulares homogéneas (Mosmann, 1983) (Vistica et al, 1991).

Como parte de los esfuerzos encaminados a optimizar la eficacia del laboratorio, se han investigado ensayos alternativos a las sales de tetrazolio, entre los que se encuentran una serie de marcadores de proteínas y macromoléculas. Los marcadores incluyen siete reactivos aniónicos que se unen a aminoácidos básicos residuales de las proteínas y, trece reactivos catiónicos que se unen a las cargas negativas fijadas de las macromoléculas biológicas. De todos los reactivos probados, la sulfo-rodamina B (SRB) da la mayor combinación de intensidad de marcaje, razón señal-ruido, y linealidad con el número celular. La SRB es un reactivo aniónico que, en ácido acético diluido, se une electrostáticamente a los aminoácidos básicos de las células fijadas con ácido tetracético. (Boyd, 1989). El ensayo con SRB ofrece mayores ventajas prácticas sobre el

ensayo con MTT y otros ensayos con tetrazolio. Estos últimos incluyen una etapa dependiente del tiempo en las que las células son incubadas con tetrazolio, y el número de células viables se estima en base a la cantidad de formazan producido. Cuando se manejan en el laboratorio muchos miles de placas de 96 pocillos por día, la programación de este paso y la lectura subsiguiente de las placas llega a ser engorroso. En los ensayos con la SRB, las células en los pocillos son fijadas químicamente al final del ensayo, pe[illegible]diendo tinciones simultáneas y un procesado mayor de baterías de placas sin pasos donde el factor tiempo es crítico.

I-2.1.3.- Test para la medición de la incorporación de precursores radiactivos.

El desarrollo de test predictivos que miden la incorporación de precursores radiactivos, permanece aún en contínua investigación. En este caso, el trabajo de Bickis y colaboradores (1966) proporciona el modelo para el mencionado tipo de estudio (Bickis et al, 1966). El efecto de los fármacos se estima por los cambios sufridos en la incorporación de precursores radiactivos en el ADN, ARN y proteínas. Se ha conseguido una aceptable correlación clínica, empleando suspensiones celulares incubadas 1 hora con el radiotrazador, tras someterlas al influjo de las drogas (Volm et al, 1979). No obstante numerosos estudios indican, que la medición de parámetros bioquímicos individuales en cortos períodos de tiempo tras la exposición con un determinado fármaco, puede no proporcionar la medida exacta de la supervivencia celular (Roper & Drewinko, 1976). Por el contrario, para Daidone y colaboradores (1985) el grado de especificidad en cuanto, a la sensibilidad ó resistencia al quimioterápico es alta, 75% y 81% respectivamente.

I-2.1.4.- Test evaluador de la población celular clonogénica.

A diferencia de los test anteriormente mencionados, que miden el efecto de la droga en el total de la población celular, los ensayos clonogénicos pretenden valorar la fracción de células madre -stem cells-, que hoy se conoce, son las responsables de la progresión del tumor y no de aquellas células de crecimiento lento ó senescentes postmitóticas ó terminales (Hamburger, 1981).

El término de stem cells fué introducido por Till y McCulloch (1961), y se aplica a toda célula con capacidad de dar origen en su progresión natural, por sucesivas divisiones, a un gran número de células hijas.

La capacidad de las células formadoras de clonas bajo condiciones artificiales puede ser medida y es aceptado, después de realizar numerosos ensayos con tumores humanos y de

animales así como con células hematopoyéticas clonogénicas, que aquellas células con capacidad de formar colonias en condiciones experimentales se corresponden con las células madres in vivo (Hamburger, 1981).

El diseño experimental se debe a Hamburger y Salmon (1977) y sus resultados señalan una excelente correlación en la predicción de la resistencia a quimioterápicos en el 100% de los casos y en menor medida (70%), en la sensibilidad a los mismos, comparado con la respuesta clínica de los pacientes (Salmon et al, 1978). En una revisión posterior sobre 1582 ensayos con 258 correlaciones clínicas, establecieron que la seguridad con la que se puede predecir la sensibilidad in vivo del quimioterápico es del 57% y la resistencia en el 92% (Bertelsen et al, 1984), utilizando como criterio, la inhibición de >50% de colonias formadas con respecto al control, para definir la sensibilidad ó resistencia al agente testificado.

I-2.1.5.- Estimación bioquímica de la captación del fármaco ó de sus metabolitos generados tras su biotransformación.

Las células recientemente aisladas ó en cultivo primario, así como los cultivos de líneas inmortales, son utensilios valiosos a la hora de conocer el efecto de agonista ó antagonista de una sustancia a nivel de receptores (Freshney, 1986).

Las técnicas bioquímicas para cuantificar la respuesta de los fármacos mediante diversas señales originadas a través de receptores, como las asociadas a canales iónicos, a proteinas G, a tirosina-quinasas, ó a receptores citosólicos/nucleares, son eficaces y fáciles de realizar en un laboratorio medianamente dotado. La medida de potencial de membrana, conductividad ó calcio intracelular pueden, hoy día, efectuarse incluso en célula única. La medida de activación de protein-quinasas a través de receptores asociados a proteina G es también una práctica rutinaria en la evaluación de la acción de una sustancia.

Las acciones de una misma sustancia pueden ser diferentes según las células, dependiendo de los receptores que expresen. Esto hace necesario la elección de la célula adecuada ó bien un sondeo en los tipos fundamentales de células (Hollenberg, 1990).

Un aspecto que no debe descuidarse es el metabolismo de la sustancia exógena ó xenobiótico y para ello es importante el estudio de sus transformaciones en las células hepáticas aisladas, ó en células de pulmón que también tiene gran capacidad para transformar las sustancias exógenas. Este último aspecto requiere ser estudiado con cuidado, pues puede condicionar una etapa importante en los mecanismos de toxicidad (Miras, 1992).

I-2.1.6.- Detección del fenotipo celular de multirresistencia a fármacos.

Uno de los principales problemas del tratamiento quimioterápico del cáncer es la resistencia que las células tumorales presentan frente a los fármacos utilizados, ya sea antes, durante ó después de la terapéutica. Este fenómeno, que en principio aparece frente a un determinado fármaco, en muchas ocasiones se desarrolla de manera cruzada con otros compuestos diferentes, como ya se describió en los años 70 por Biedler y Riehm (1970) en células de hamster que selecionadas por su resistencia a actinomicina-D, desarrollaron simultáneamente resistencia frente a vincristina, vinblastina y daunomicina; fenómeno que se denominó "Multidrug Resistance" (MDR). (Casals & Cordon, 1989) (Benard et al, 1990).

I-2.1.6.1.- Glicoproteina P-170.

Las primeras descripciones de esta glicoproteína, y de su implicación en la resistencia múltiple a drogas, fueron realizadas por Juliano y Ling (1976) en estudios "in vitro" sobre células mutantes de carcinoma de ovario de hamster (CHO), que presentaban resistencia no sólo a colchicina sino también a actinomicina D. Ya en estos primeros estudios se consideraba que la P-170 actuaba como una bomba de reflujo, para diversos citotóxicos, en las células cancerosas que se habían hecho resistentes.

Estudios sobre la genética de la GP-170.

Los estudios de biología molecular han demostrado que la MDR se relaciona con la sobreexpresión de algunos genes denominados "mdr" en ratón y en humanos, y "pgp" en hamster. Con las técnicas de clonación del ADN se ha llegado a la conclusión de que los genes de la P-170 se amplifican en las células con MDR, y que esto se acompaña de un aumento en la expresión del mARN específico. La existencia de diferentes tipos de amplificación y de secuencias sugirió que los mdr constituyen una familia multigenética (Scotto et al, 1986).

En roedores se han descrito tres tipos de genes relacionados con la MDR. En ratón el mdr-1 (también llamado mdr1b) (Gross et al, 1986), mdr-2 (Gross et al, 1988) y el mdr-3 (también llamado mdr1a) (Croop et al, 1989), teniendo los dos primeros, pero no el último, capacidad de transferir la MDR a células que previamente no lo son. En hamster, Jongsma y colaboradores (1987) estudiaron la secuencia génica y describieron cinco grupos de genes que se encontraban amplificados en estas células con expresión de MDR, de los que tan sólo tres (los grupos 2, 4 y 5) son imprescindibles, aunque exclusivamente se produce una verdadera MDR por la sobreexpresión del grupo 2, mientras que la amplificación de los otros dos se produce de manera fortuita sin conferir expresión de GP-170. También observaron que el grupo 4 codifica

una proteína citosólica llamada Sorcin (V19), que se sobreexpresa en las células MDR positivas (van der Bliek et al, 1986).

En células humanas se han caracterizado principalmente dos genes denominados mdr-1 y mdr-2 (van der Bliek et al, 1986) (Nooter & Herweijer, 1991) que se localizan en la banda q21-1 del cromosoma 7 (Callen et al, 1987) unidos por un fragmento de ADN de 330 kb. Ambos codifican un mARN de 4,5 kb y 4,1 kb respectivamente, y su transcripción en proteínas ofrece una estructura primaria y una orientación de las estructuras secundaria y terciaria en la membrana muy similar. La función que estas proteínas tienen en la células parece diferente pues sólo el gen mdr-1 confiere un fenotipo MDR(+) (Roninson et al, 1990), a diferencia del mdr-2, que no lo induce. Esto se ha podido comprobar cuando células fenotípicamente MDR(-) a las que se les transfirió el mdr-1 insertándolo en su genoma, se transformaron en células MDR(+), mientras que igual manipulación con el mdr-2 no consiguió tal efecto (Sugimoto & Tsuruo, 1987) (Lincke et al, 1990).

Un gen relacionado con los anteriores es el mdr-3 (también llamado PGY3), descrito por van der Bliek y colaboradores (1987), del que existen tres variantes: A, B y C (van der Bliek et al, 1988). Este gen tiene una secuencia de ADNc homologable a la del mdr-1 en un 80%. La asociación de ambos ha sido estudiado recientemente en varios tipos de leucemias. Herweijer y colaboradores (1990) demuestran que el mdr-1 se expresa en todos los tipos de leucemias excepto en la B-PLL, y que el del mdr-3 lo hace exclusivamente en las leucemias de origen B (Nooter et al, 1990). La transfección de la variante A del mdr-3 origina un fenotipo hacia MDR(+) (van der Blieck et al, 1988). Sin embargo Nooter y colaboradores (1990) comprobaron, que de manera análoga a lo que ocurre con el mdr-1 y su expresión en P-170 cuando las células que lo contienen son expuestas a moduladores de la MDR (calcioantagonistas y ciclosporina A), las células MDR-3(+) expuestas a los mismos moduladores experimentaban una inhibición del fenómeno MDR, aumentando el quimioterápico en estudio en el interior celular; por lo que este estudio considera la posibilidad de que el mdr-3 y su expresión proteica tengan alguna función desconocida que intervenga en el fenómeno de MDR (Nooter et al, 1990).

La capacidad de una célula tumoral de sobreexpresar los genes relacionados con la MDR puede adquirirla antes de someterla a la acción de drogas (adquisición "per se") o desarrollarla durante el tratamiento ó la exposición a los fármacos. La adquisición "per se" podria explicarse considerando la posible activación de un oncogen que indujera la expresión y sobreexpresión de los genes mdr, como se ha podido demostrar en modelos experimentales de hepatocarcinogenesis en ratas, las cuales al desarrollar un hepatocarcinoma aumentaban la expresión de genes mdr y la GP-170 a nivel del hepatocito se mostraba varias veces superior al control

(Thorgeirsson et al, 1987). La relación que pueda existir entre la proliferación tumoral de neoplasias MDR(+) (estudiada por el anticuerpo Ki-67) y su expresión de P-170 ha sido recientemente estudiada. En un trabajo sobre líneas celulares de tumores renales se advierte una correlación positiva en la expresión de ambos antígenos, aunque el valor pronóstico de las células Ki-67(+) y su fenotipo MDR(+) no queda aclarado (Efferth et al, 1990). Sin embargo, otros estudios realizados sobre neoplasias malignas hematológicas estudiando la expresión de dichas moléculas, niegan tal correlación (Musto et al, 1990).

Estudios sobre la función bioquímica y fisiología de la GP-170.

La parte proteica de la glicoproteina P-170 es un polipéptido de 1280 aminoácidos que está compuesto por dos partes aproximadamente iguales que son homólogas entre sí: El segmento N-terminal (residuos 1-637) y el fragmento C-terminal (residuos 638-1280) (Figura 2). Hay muchas semejanzas y sectores completamente idénticos en una y otra parte. Cada una contiene un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico. El dominio hidrofóbico contiene seis segmentos situados en el espesor de la membrana. El dominio hidrofílico cuenta con fragmentos tanto en el exterior como en el interior celular. La secuencia sería la siguiente: N-terminal (1-48), región hidrofóbica 1 (49-350), región hidrofílica 1 (351-637), fragmento de unión (638-708), región hidrofóbica 2 (709-993) y región hidrofílica 2 (994-1280) en el C-terminal. Según el análisis del algoritmo de Eisenberg y colaboradores (1989), la proteína tiene seis fragmentos hidrofóbicos transmembrana de 21 aminoácidos cada uno, que se designan del 1-6 y del 1a-6a. Respecto a la parte no proteica, se han localizado 8 posibles puntos de glicosilación en las posiciones 14, 73, 91, 96, 103, 702, 87 y 988. Otro importante hecho a destacar en la estructura cuaternaria de esta proteína es la existencia de dos pares de fragmentos (NB1: 426-433/541-551 y NB2: 1068-1075/1184-1196) que pueden ligarse a los nucleótidos del ATP lo que sugiere un lugar de unión de ATPasa, y por tanto una función energía dependiente.

Todas estas características bioquímicas y enzimáticas se han relacionado y estudiado comparativamente con enzimas bacterianas pericitoplásmicas (que se situan en el interior de la pared bacteriana). Se ha encontrado que existe una alta similitud entre la secuencia de los fragmentos NB1 y NB2 con la de aminoácidos de enzimas como la hisP, malK y oppD que se encargan de transportes activos de aminoácidos, así como de productos de síntesis bacteriana como hemolisinas y otras enzimas; pero la similitud no se da fuera de estos fragmentos. Estos hallazgos apoyan la concepción de una GP-170 que vierte al exterior sustancias intracelulares a modo de bomba ATP-dependiente; así también estos datos situan a la P-170 en un lugar filogeneticamente muy antiguo al presentarse en seres vivos tan primitivos como los procariotas (Gross et al, 1986) (Gottesman & Pastan, 1990).

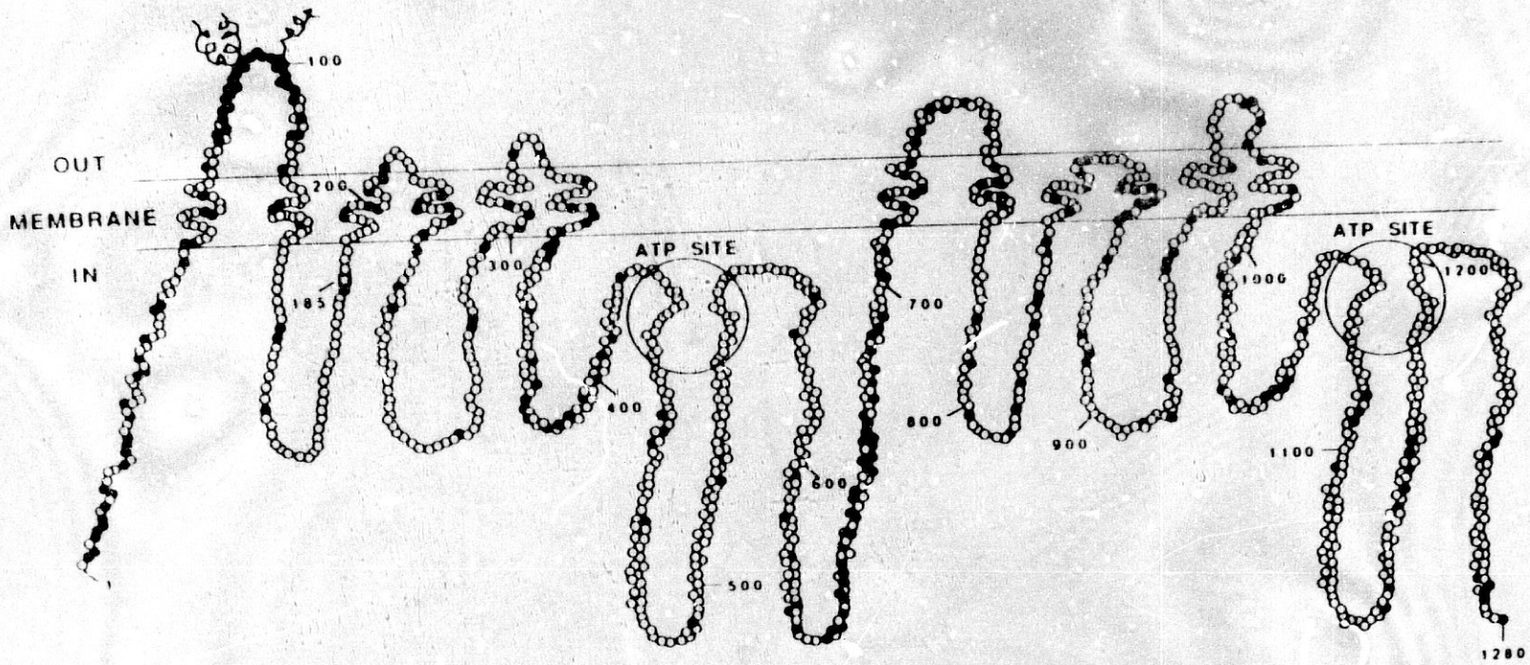


FIGURA 2. SECUENCIA AMINOACIDA Y ESTRUCTURAS SECUNDARIAS Y TERCIARIA DE LA GP-170.

(Tomado de Gottesman, MM; Pastan, I.; J.Biol.Chem. 1988)

Presentación en tejidos normales y tumores. Valoración inmunohistoquímica y por citometría de flujo.

Hay que tener presente, que en la actualidad se están realizando estudios para conocer la verdadera distribución hística y celular de la P-170 en tejidos sanos.

Se ha demostrado expresión de P-170, mediante hibridación in situ e inmunohistoquímica, en células epiteliales principalmente con funciones secretoras y excretoras: En la superficie de los hepatocitos, en el polo biliar y conductillos biliares; en el borde en cepillo de las células de revestimiento epitelial de los túbulos contorneados proximales; en la superficie luminal de las mucosas de yeyuno y colon. Otras células especializadas que expresan P-170 son el epitelio de las glándulas sudoríparas de la piel, el epitelio de revestimiento bronquial, células del epitelio glandular prostático, mamario, endometrial y tiroideo, células acinares pancreáticas, células trofoblásticas placentarias, en las células adrenales tanto corticales como medulares y células endoteliales de los capilares del SNC. Esta peculiar distribución permite especular que la P-170 representa, en la fisiología hística normal, un papel de bomba detoxicante de sustancias xenobióticas (Sugawara et al, 1988) (Casals & Cordon-Cardo, 1989).

Para la contrapartida neoplásica, numerosos autores han evaluado la expresión de mdr-1 sobre biopsias de casi todos los tipos tumorales y ha sido detectada virtualmente, con menor o mayor nivel de intensidad, en casi todos ellos: Carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias (Goldstein et al, 1989).

En cultivo ha sido igualmente demostrada entre otras, en las líneas permanentes linfoides (CEM/VLB_{1000}) de mieloma humano (8226/DOX_6, 8226/DOX_{40}) (Dalton et al, 1989a), de neuroblastoma (SK-N-SH) (Bates et al, 1991), de carcinoma epidermoide, de carcinomas de mama (MCF-7/ADR) (Gervasoni et al, 1991) y renales (Efferth et al, 1990) etc. En general, son líneas procedentes de células progenitoras sensibles, que han adquirido el fenotipo mdr tras su exposición a quimioterápicos como la doxorubicina ó adriamicina. En concreto, para las líneas testificadas en este trabajo no aparecen en la literatura cotejada, reseñas sobre la expresión ó no de P-170, salvo para el caso particular de la línea MCF-7 (Gervasoni et al, 1991).

Tanto en tejidos normales como en tejidos tumorales la detección de la P-170 se realiza mediante anticuerpos monoclonales (AcMo) (Grogan et al, 1990); de igual forma, mediante citometría de flujo es posible cuantificar la expresión de manera más exacta, sobre todo si se realiza sobre cultivos celulares, donde es fácil obtener suspensiones celulares individualizadas.

Los principales anticuerpos monoclonales son:

A) AcMo JSB-1:

Caracterizado por Sheper y colaboradores (1988), se obtuvo de celulas ováricas de hamster chino (CHO) que eran resistentes a la colchicina. Para que el AcMo se una a la P-170 es necesario que la membrana de la célula esté permeabilizada, lo que hace pensar que el epitopo que reconoce es de localización intracitoplásmica, más concretamente, muy cerca y unido al epitopo que identifica el AcMo C219 (Sheper et al, 1988) (Dalton et al, 1989b). También se especula, que el lugar donde se une el AcMo es la membrana plasmática y las membranas del aparato de Golgi. El JBS-1 ofrece, según las experiencias originales de Sheper y colaboradores (1988), excelentes tinciones en preparaciones citológicas, siendo preferible secar al aire sin fijar ó una fijación ligera con acetona (10 minutos, 20°C).

B) AcMo C-219:

Caracterizado por Kartner y colaboradores (1985) que detecta un epitopo intracitoplasmático en la vertiente citoplásmica de la membrana celular. En el análisis de la proteína de hamster, este AcMo detecta un segmento de 6 aminoácidos que se situan cerca de los dominios ATP-dependientes más cercanos al N-terminal (Sheper et al, 1988). El isotipo de este AcMo es IgG_1. Weinstein y colaboradores (1990) han descrito lo que ellos llaman inesperada expresión de una proteína reactiva frente al C-219 que se situa en el aparato de Golgi (G-C219-RP), y han descrito dos tipo de patrón de tinción en epitelio normal de colon y de ureter (difuso y perinuclear). Además estudiaron la relación existente entre la expresión G-C219-RP y los grupos sanguíneos de los tejidos utilizados, llegando a la conclusión de que el grupo A se asocia a dicha expresión en los tejidos normales y patológicos estudiados.

C) AcMo C-494:

Este AcMo es el único que detecta la expresión de P-170 especificamente codificada por los genes mdr-1 en el humano y pgp1 para el hamster; más concretamente se une a un pequeño fragmento cercano a los dominios ATP-dependientes que se hallan en la mitad C-terminal. La transfección de mdr-1 a células mdr(-) provocó la positividad de este AcMo en dichas células, lo que prueba que reconoce unos péptidos directamente relacionados con el mdr-1, que como más arriba se señaló, es el portador del genotipo MDR(+) (Georges et al, 1990).

D) AcMo C-32:

Se ha caracterizado sólamente frente a P-170 de hamster (Georges et al, 1990). Reconoce una secuencia de 13 aminoácidos situados entre los dos dominios ATP dependientes

de la mitad C-terminal. No es útil para tejidos humanos ni de ratón

E) 265/F4:

Caracterizado por Lanthan y colaboradores (1985). Poco usado, sobre todo mediante técnica de inmunofluorescencia (Effert et al, 1990).

F) MRK-16:

Obtenido por Hamada y Tsuruo (1986), detecta específicamente una P-170 sólo humana ya que no lo hace frente a ratón ó mono. El epitopo al que se une se encuentra en la superficie externa de la membrana celular e incluye un péptido humano que expresaban las células de ratón transfectadas con mdr-1. Este epitopo es resistente a los aldehidos y a las proteasas (Willingham et al, 1987). La tinción del MRK16 detectable en la membrana plasmática y en la luz del aparato de Golgi, con muy débil tinción en el retículo plasmático, sugiere que este AcMo podría detectar los cambios experimentados por el péptido en el aparato de Golgi, como puede ser la glicosilación (Axiotis et al, 1991). Hay trabajos que estudian la expresión del C-219 a nivel del aparato de Golgi y lo denominan G-C219-RP (Golgi-C219-Reactive Protein).

Se ha demostrado la expresión de P-170 usando el MRK16 en tejidos normales (Suguwara et al, 1988) y tumorales: tumores renales (Efferth et al, 1990), sarcomas (Gerlach et al, 1987), linfomas (Pileri et al, 1991), mieloma (Dalton et al, 1989b), adenocarcinoma de esófago y de estómago (Robey-Cafferty et al, 1990), adenocarcinomas de endometrio (Axiotis et al, 1991), luecemias (Musto et al, 1991), etc.

Hemos encontrado, tras el exhaustivo rastreo bibliográfico realizado, escasas referencias acerca de la cuantificación de la glicoproteína P-170 por citometría de flujo, tan solo se limitan a detectar su presencia o ausencia. Entre ellas destaca el estudio de Toffoli y colaboradores (1991) sobre líneas celulares de carcinoma de colon (HCC) y la sublínea resistente a drogas de la misma (SW948/HCC), cuantificando la expresión de P-170 mediante el AcMo MRK-16 .

Modulación farmacológica de la MDR.

Desde las primeras descripciones de la P-170 y su base genética, se han estudiado otros fármacos (Tsuruo et al, 1981), sobre todo calcioantagonistas y actualmente la CsA, que interfieren en la expresión y funcionalismo de esta glicoproteína.

Los compuestos que tienen una acción inhibitoria sobre la función de expulsión de la P-170 se dividen en cinco clases:

a) **Bloqueantes de los canales del calcio**: como el verapamil, nifedipina, nicardipina

(Mickisch et al, 1990) y derivados de éstos que han perdido su función bloqueante irreversible pero sí la manifiestan de manera reversible.

b) **Reserpina, Quinidina** (Tsuruo et al, 1984), **Lidocaina.**

c) **Fenotiacinas.**

d) **Derivados de los alcaloides de la Vinca y antraciclinas** que han perdido su carácter citotóxico.

e) **Ciclosporina y sus derivados** (Slater et al, 1986).

Las sustancias que han demostrado un importante efecto en cuanto a la modulación son los que a continuación mencionamos:

-- **Bloqueantes de los canales del calcio (BCC).**

Todos los trabajos hasta ahora desarrollados apuntan hacia una unión competitiva de los BCC (el más estudiado ha sido el verapamil) con la estructura de la P-170 de igual manera a como lo hacen las drogas quimioterápicas. Esa unión competitiva inutiliza a la P-170 para expulsar los fármacos a los que se ve sometida la célula en estudio. Es importante señalar que esta unión BCC+P-170 no se da en células normales (Safa et al, 1987). Por todo ello los BCC han tenido efecto como sensibilizadores en aquellas células MDR(+) (Hu et al, 1990), aunque ensayos clínicos efectuados sobre pacientes de cáncer de ovario con expresión MDR(+) han sido poco alentadores ya que las dosis requeridas para tener efecto sensibilizador eran cardiotóxicas (Figueredo et al, 1990).

-- **Influencia de la ciclosporina y sus derivados en la modulacion de la P-170.**

Una cuestión por analizar es el posible papel que la CsA juega sobre el control de la expresión de la glicoproteina P-170 inductora de la multirresistencia de los tumores a las drogas quimioterápicas, sobre todo adriamicina, vincristina, doxorubicina y vinblastina (Gottesman & Pastan, 1988b) (Twentyman, 1988b) (Hait et al, 1989).

En tejidos normales.

La GP-170 se considera, con general aceptación, que como función principal interviene en la detoxicación celular de sustancias exógenas. Se ha detectado P-170 en aquellas células que tienen gran capacidad secretora (Sugawara et al, 1988), aunque apenas existen trabajos que relacionen los niveles intracelulares de P-170 con la capacidad detoxicante de cada órgano. A este respecto, nuestro grupo de trabajo ha realizado algunas aportaciones en biopsias renales postransplante (Gª del Moral et al, 1991).

En tejidos tumorales.

La CsA y sus derivados tienen una acción inhibidora de la P-170 en tumores de Ehrlich (Meador et al, 1987), tumor testicular humano (Scheuler & Osieka, 1987), en líneas celulares de carcinoma de células pequeñas de pulmón (Twentyman et al, 1987), en células de leucemia murina (Nooter et al, 1990) y sobre células de ovario de hamster resistentes a la daunorubicina (Silvermann et al, 1989). La regulación de la CsA sobre la expresión de los genes mdr en líneas tumorales está demostrada (Nooter et al, 1990) (Herweijer et al, 1990) dándose una clara correlación positiva entre el nivel previo de genes mdr y el grado de acumulación de fármacos que las células MDR(+) experimentan tras la exposición a CsA. En este sentido, desde 1988 numerosos grupos de trabajo están aportando continuas experiencias sobre la modulación que realiza la CsA sobre la P-170, independientemente ó en conjunción con los BCC (Meador et al, 1987) (Herweijer et al, 1990) (Handschumacher, 1991).

I-2.1.6.2.- **Otros mecanismos de resistencia.**

Los mecanismos bioquímicos y celulares conocidos que se creen implicados en la MDR son muy variados, podemos citar:

a) Alteración de niveles enzimáticos:

a.1.- Complejo Glutation, entre éstos podemos citar el Glutation-S-transferasa perteneciente a la fase II del citocromo P-450 (Volm et al, 1991), que se conjugan con sustratos electrofílicos haciéndolos de ese modo menos tóxicos y más facilmente excretables. Previenen fenómenos de oxidación celular, y se ligan a sustancias intracelulares imposibilitando su acción tóxica. Otro enzima es el Glutation peroxidasa que cataliza la reducción de tóxicos peróxidos a alcoholes a expensas de la oxidación de un grupo sulfhidrilo. El aumento de estos enzimas en algunas líneas tumorales (por ejemplo MCF-7) aumenta el poder de detoxicación de las celulas ante ciertas drogas. (Redmond et al, 1991).

a.2.- Aril hidrocarbón hidroxilasa, que pertenece a la fase I del citocromo P-450, convierte muchas drogas en su forma activa mediante la adición de grupos hidroxilos y de moléculas de oxígeno, de esa manera la reducción en su cantidad ó en su actividad hace que algunos fármacos no puedan activarse y por lo tanto pierden su efecto antiproliferativo. (Toffoli et al, 1991).

a.3.- Proteinquinasa C, pudiendo presentarse disminuida como en el caso de algunas líneas de leucemia linfoblásticas, ó aumentada en la línea MCF-7 resistente a la doxorubicina, no pudiéndose correlacionarse adecuadamente con los niveles de MDR de las líneas estudiadas (Schwartz et al, 1991).

a.4.-H^+-ATPasa vacuolar, que tiene importancia en la expulsión de tóxicos celulares que

utiliza ATP generado por este enzima. El mecanismo exacto no se conoce, pero parece relacionarse con la actividad ATPasa que se le atribuye.

b) Sustancias que aumentan los factores reparadores del ADN alterado por efecto de quimioterápicos (Roberts et al, 1989). Como caso contrario a dichas sustancias tenemos la estreptozotocina que inhibe una serie de enzimas reparadoras, incrementando con ello la capacidad terapéutica de algunas nitrosoureas (Marx, 1986).

c) Alteraciones de enzimas diana para ciertos fármacos, como es el caso de los cambios de la dihidrofolato-reductasa que es el enzima sustrato del metotrexate (Rodenhuis et al, 1986), ó la topoisomerasa II que lo es de la doxorubicina (Zwelling et al, 1990).

I-2.2.- MODELOS EXPERIMENTALES IN VIVO.

Desde su inicio en 1955 hasta 1975, el caballo de batalla del programa de screening del Instituto Nacional del Cancer fue la leucemia L1210 de los roedores. Posteriormente, se consiguió que la selección de productos químicos fuera más racional al emplear un panel de tumores murinos, diseñado para cuestionar la validez clínica y la especificidad orgánica de los modelos. La criba inicial se efectua utilizando la leucemia murina P388, y los agentes que demuestran actividad sobre esta neoplasia pasan a ser testificados frente al panel de tumores que incluye: La leucemia L1210, el melanoma B-16, el sarcoma M5076 y tumores humanos heterotrasplantados a ratones atímicos (Devita, 1988).

Constituye un dogma inherente a todos los sistemas de screening la necesidad de que el fármaco demuestre su actividad en las fases preclínicas antes de ser probado en humanos.

A pesar de la dificultad que entraña el extrapolar los resultados obtenidos in vitro a in vivo, en la actualidad se tiende a sustituir los modelos en animales por modelos in vitro validados. Con este fin se vienen realizando jornadas para tratar y poner a punto nuevos modelos de validación in vitro (Castell, 1992) (Walum, 1992).

I-3.- CARACTERISTICAS DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS CELULARES Y CURVAS DE CRECIMIENTO IN VITRO.

El crecimiento de las células en cultivo se ajusta a una curva trifásica de morfología sigmoidea, según el modelo Gonpertziano, diferente para cada línea celular. El conocimiento de

las características de cada curva nos permite comprender el comportamiento biológico y diseñar las distintas experiencias con mayor fiabilidad. Los diferentes períodos son los siguientes:

- **Fase de retraso ó "lag".**

Es el tiempo que sigue a la siembra o subcultivo celular durante el cual las células, en su mayor parte, permanecen en reposo sin evidencia de un incremento celular franco. Es un período de adaptación en el que reaparecen elementos como el glicocalix, perdido durante la tripsinización, se produce la adhesión al sustrato y su expansión, aumenta la producción de enzimas como la ADN polimerasa, incremento que va seguido de la síntesis de nuevo ADN y proteínas estructurales.

La duración de esta fase es posible determinarla mediante la curva de crecimiento, de forma que estaría definida por el punto de intersección obtenido con la extrapolación de una línea que continuara hacia abajo la dirección de la trazada en la fase exponencial y la línea horizontal que parte del punto que señala el valor del inóculo celular inicial.

- **Fase logarítmica o "log".**

Es el período de incremento exponencial del número de células, sigue a la fase "lag" y termina después de una ó dos duplicaciones celulares, una vez alcanzada la confluencia en los cultivos. La duración de la fase logarítmica depende de la densidad celular de la que partimos.

En esta fase la fracción de crecimiento (Mendelsohn, 1963) es elevada, habitualmente mayor del 90%, la población es más uniforme y la viabilidad alta (Freshney, 1983), por todo ello es el período elegido para desarrollar las experiencias. Hay que tener presente que las células se encuentran distribuidas al azar en las diferentes fases del ciclo celular.

De este período se puede extraer un nuevo parámetro que es el tiempo de duplicación (**Td**), definido como el tiempo que necesita el cultivo para incrementar al doble su población celular en mitad de la fase exponencial.

- **Fase de meseta o "plateau".**

Este período no lleva implícito el cese completo del crecimiento y división celular sino más bien el equilibrio en el seno del cultivo de la fracción de células proliferantes y el número de células que mueren. Es el sector de la curva de crecimiento que plantea mayores dificultades

en su cálculo, pues depende en gran medida no sólo del tipo de células sino de la frecuencia de recambio del medio de cultivo y de las dimensiones del soporte sólido donde crecen.

I-4.- ESTIMACION DE LA FRACCION DE CRECIMIENTO CELULAR.

Se debe a Mendelsohn la definición del concepto teórico "Fracción de crecimiento (FC)", como la relación existente entre el número de células proliferantes y el número total, proliferantes y quiescentes, en un cultivo de elementos normales o tumorales (Mendelsohn, 1963).

I-4.1.- METODOS DE EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR.

I-4.1.1.- Contaje de mitosis.

Es clásico su empleo, por ser la única fase reconocible por simple examen morfológico y mantiene su vigencia pues proporciona información de carácter predictivo sobre muchos tumores, tales como linfomas (Ellison et al, 1987) (Ackerman et al, 1987), melanomas (Ronan y Das Gupta, 1988) y especialmente en los tumores de musculo liso (Silverberg, 1976).

En el caso concreto del melanoma, se han establecido incluso, fórmulas matemáticas con el propósito de calcular con mayor exactitud el curso pronóstico del tumor en estadio clínico I (Schmoeckel & Braun-Falco, 1978) (Kopf et al, 1987). Esta fórmula denominada Indice Pronóstico (IP), relaciona el método de Breslow (profundidad en milímetros del melanoma) con el número de mitosis por milímetro cuadrado, sobre preparaciones histológicas convencionales.

I-4.1.2.- Contenido en ADN.

La sintesis de ADN durante la fase S del ciclo celular, puede ser medida mediante el uso de precursores tritiados (timidina H^3), análogos de dichos precursores (incorporación de bromodeoxiuridina, BrdUrd), por citometría de flujo ó mediante análisis de imagen.

La captación de timidina tritiada y su lectura, bien autorradiográfica ó con contador de centelleo, tiene el inconveniente de necesitar la incubación previa del tejido con el precursor radiactivo, que en el caso de biopsias ó de cultivos celulares no constituye problema alguno.

La BrdUrd, es también incorporada al ADN y su evaluación se establece con anticuerpos

específicos frente a dicha molécula (Gratzner 1982) ó por citometría de flujo (Dolbeare et al, 1983).

En la actualidad las técnicas de citometría de flujo y de análisis de imagen son las que gozan de mas predicamento. La citometría de flujo es mas sensible para determinación de ADN, pero el análisis de imagen, aunque trabaja con densidades ópticas y sin que exista relación estequiométrica, permite visualizar lo que va a cuantificarse.

I-4.1.3.- **Métodos histoquímicos.**

En los últimos años los marcadores histoquímicos de progresión tumoral han sido ampliamente estudiados con fines diagnósticos y pronósticos por parte del patólogo. Quizás el más difundido es el anticuerpo **Ki-67**, obtenido por Gerdes y colaboradores (1983) (1984), que reconoce un antígeno nuclear expresado exclusivamente por las células proliferantes (G1, S, G2, M) y ausente en las células quiescentes (Go).

Recientes publicaciones demuestran una estrecha relación entre la inmunotinción frente al **Ki-67** y otras pruebas que valoran la proliferación celular, como es la la incorporación de timidina tritiada ó BrdUrd (Kamel et al, 1989). Aunque no se debe olvidar, que fenómenos como la deprivación de factores nutricios pueden modificar la mencionada relación (Dierendonck et al, 1989). Experiencias realizadas con la línea celular HeLa, encuentran que la reducción se establece de forma paralela (Sasaki et al, 1989).

El antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal **Ki-67** aún no ha sido por completo caracterizado. Se sabe que corresponde a una proteína no histona ensamblada por cadenas polipeptídicas, de un peso molecular aparente de 345 y 395 Kd, codificado por una secuencia génica hasta el momento desconocida (Gerdes et al, 1991). Tampoco se conoce su contribucion exacta en la actividad proliferativa. No obstante, se ha observado que la expresión máxima se consigue en la fase G2M de las células en crecimiento exponencial (Sasaki et al, 1987a) y queda ampliamente dilucidado, sobre líneas celulares experimentales, que las variaciones de expresión del antígeno son causa y consecuencia de modificaciones en la proliferación celular y no un mero fenómeno asociado (Sasaki et al, 1989). A tenor de los datos que se disponen, ha sido posible distinguir el Ag Ki-67 de otras estructuras asociadas a proliferación como el caso de la ciclina, p53, c-myc y otros oncogenes (Gerdes et al, 1991).

I-5.- EFECTOS BIOLOGICOS DE LOS DISOLVENTES UTILIZADOS EN LA PREPARACION DEL FARMACO (CsA).

I-5.1.- ETANOL.

Este alcohol es utilizado como disolvente en aquellos casos que es necesario su incorporación para mejorar la solubilidad de las drogas.

Ha sido estudiado el efecto del etanol sobre cultivos celulares y no se han observado modificaciones de las células tratadas frente a los controles a bajas concentraciones. En la línea C-6 de glioma de rata, el efecto citotóxico del etanol se produjo a concentraciones de 200 y 100 mM, mientras que a 50 mM no se evidenció efecto citotóxico alguno y el patrón de crecimiento fué similar al del control. Los cambios morfológicos observados fueron, una disposición mas ordenada de las células y un tamaño celular claramente mayor que en el control (Alvaro, 1989).

Tras realizar tinciones convencionales sobre líneas celulares expuestas a etanol 50 mM, el crecimiento sobre el sustrato de cristal fué el habitualmente mostrado por la línea, con la particularidad de que se observaron los elementos celulares con un citoplasma eosinófilo extenso y manteniendo su morfología habitual (Alvaro, 1989).

I-5.2.- ACEITE DE RICINO POLIOXIETILADO (CREMOPHOR).

El Cremophor es utilizado como vehículo en la preparación de inyectables de CsA vía intravenosa (Grevel et al, 1988).

Se ha publicado que el Cremophor causa efectos adversos sobre la función renal tales como una reducción aguda en el flujo de sangre renal de aproximadamente el 50% (Thiel et al, 1986).

Estudios realizados sobre la línea epitelial renal de cerdo LLC-PK_1 demostraron que el Cremophor es citotóxico cuando se utiliza a concentraciones altas, así como que altera la morfología de estas células a bajas concentraciones (Nässberger et al, 1991). Cuando las células fueron incubadas con 10^{-2}-10^{-1}% de Cremophor durante 1 día, se produjeron alteraciones similares a las observadas a bajas dosis de CsA en algunas células, mientras que no se apreció ningún cambio después de la incubación con 10^{-4}% de Cremophor durante 4 días.

Considerando las relativamente grandes cantidades de Cremophor usadas como vehículo

para la CsA, incluso en conexión con dosis bajas de mantenimiento dadas a pacientes, es posible que este disolvente sea el responsable de una parte de los efectos nefrotóxicos asociados con el tratamiento de CsA (Nässberger et al, 1991).

Por otra parte se ha demostrado que el Cremophor a la concentración administrada en clínica (Sandimmun®, SANDOZ) es un potente modulador de la MDR en células de mieloma humanas (Dalton et al, 1986) (Dalton et al, 1989a), a concentraciones de proteína que de forma estrecha se asemejan a la situación in vivo, siendo sus efectos comparables a los resultados obtenidos usando CsA y verapamil (Schuurhuis et al, 1990).

Estudios clínicos en mieloma utilizando el Cremophor como modificador de la resistencia confirman los resultados in vitro. Además, el Cremophor puede pasar a ser útil en el tratamiento de tumores conteniendo GP-170 además del mieloma, puesto que se ha visto que in vitro el aceite de ricino polioxietilado es activo sobre otras células cancerígenas MDR conteniendo GP-170, como las células escamosas de cáncer de pulmón (Broxterman et al, 1989) (Keizer et al, 1989), células de cáncer de ovario, así como en células humanas de cáncer de colon intrínsecamente resistentes (Schuurhuis et al, 1990).

I-6.- FUNDAMENTOS TECNOLOGICOS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO.

De forma genérica, un citómetro de flujo se compone de tres sistemas instrumentales integrados: Un sistema de inyección y manejo de la muestra, un detector físico y óptico de los parámetros citológicos a medir y un sistema digitalizado para el proceso de los datos.
El sistema de inyección y manejo de la muestra consiste en un mecanismo hidraúlico presurizado donde se incorpora la suspensión de células a analizar, que es vehiculizada hacia un conducto capilar estrechado por una corriente coaxial de líquido sobre el que incide un estrecho haz de luz. La inyección se realiza habitualmente por un sistema volumétrico compuesto de bomba y jeringa capaz de inyectar un volumen exacto de la suspensión celular (Crosland-Taylor, 1953) (Kachel & Menke, 1979) (Pinkel & Storel, 1985).

Según el carácter del haz explorador se distinguen dos tipos de citómetros de flujo: a) De lámpara de mercurio y b) de luz láser. Los primeros han sido progresivamente sustituidos por los de tipo láser por las grandes ventajas que reportan estos últimos (Hiebert, 1979) (Wheeles & Kay, 1985).

El sistema de detección consta de (Steinkamp et al, 1982) (Wheeles & Kay, 1985) : a) Un

contado. olumétrico de tipo Coulter para el recuento de las unidades celulares que fluyen por el capilar; b) sistema óptico, formado por un detector de la luz dispersada en sentido longitudinal, un filtro espacial de selección, diversas lentes de enfoque del rayo láser sobre el haz de flujo celular y ciertos filtros y espejos que permiten seleccionar determinadas longitudes de onda en la radiación reflejada por la columna celular en estudio y c) los tubos multiplicadores capaces de recoger y transformar la luz reflejada en una débil corriente eléctrica.

El sistema electrónico digital y de análisis de datos consta de diversos amplificadores de señal, un transformador analógico-digital para convertir los pulsos electrónicos en información digital y un ordenador que almacena y analiza los datos, proporcionando estudios estadísticos y representación gráfica de los mismos (Wheeles, 1991) (Gª del Moral y O'Valle, 1992).

La calidad de un sistema de citometría de flujo se mide actualmente por sus prestaciones expresadas en sensibilidad, reproducibilidad y velocidad de análisis del instrumento en cuestión (Gª del Moral y O'Valle, 1992). La sensibilidad depende de múltiples factores (intensidad y carácter del láser, velocidad del flujo celular en la cámara, tipo de óptica y sensibilidad del detector, tipo de fluorocromos utilizados, etc.), es propia para cada instrumento y, en la mayoría de los sistemas, se cifra en un mínimo de 1000 moléculas de fluorocromo por célula analizada.

La reproducibilidad o posibilidad de obtener un mismo resultado para muestras equivalentes, depende de la estabilidad de la radiación luminosa y del flujo de la muestra, así como de la eliminación de toda reflexión luminosa no debida a la estimulación de la columna celular ("ruido del sistema"). Se considera como mínimo aceptable en torno al 1%. La velocidad de proceso ó capacidad de discriminación de c s independientes, debe estar entre cuatro y cinco mil células por segundo (Wheeles, 1991) (Gª del Moral y O'Valle, 1992).

Actualmente, los udios de citometría de flujo sobre poblaciones celulares en suspensión pret nden cubrir dos objetivos fundamentales (Carter & Meyer, 1990): 1) Analizar la cinética celular y contenido medio en ADN de la población problema y 2) Conocer y cuantificar su fenotipo inmunológico a través de la unión intermedia con anticuerpos específicos marcados con fluorocromos.

Los estudios de cinética celular y cuantificación del ADN se basan en la determinación del grado de ploidía celular y del porcentaje de células en fase S (de síntesis o duplicación del ADN) en una población celular problema. Para ello la técnica de cuantificación más empleada habitualmente, consiste en teñir el ADN nuclear con una sustancia fluorescente (por lo general, bromuro de etidio ó yoduro de isopropidio o naranja de acridina) que sometidas a la acción del

laser proporcionan fluorescencia roja o anaranjada, de forma que el contenido de ADN en la suspensión celular y la intensidad de la fluorescencia emitida son proporcionales.

A partir de estos datos puede extrapolarse, conociendo el número total de células que discurren por el capilar, el porcentaje de elementos diploides o aneuploides existente en la muestra (Utsinger et al, 1977) (Darzynkiewicz et al, 1986).

Las características del ciclo mitótico de una población celular pueden analizarse de forma más completa, mediante marcaje complementario con bromodesoxiuridina (BrdU), que es atrapada exclusivamente por las células en fase S. Con posterioridad, se colorea con ioduro de isopropidio el ADN de la población y se utiliza como marcador específico de las células en fase S, un anticuerpo anti-BrdU conjugado con fluoresceína, para practicar una doble determinación de fluorescencia roja y verde por métodos semejantes al antes descrito (Dolbeare et al, 1983) (Clevenger et al, 1985) (Sasaki et al, 1987b).

Los estudios de receptores y fenotipo celular se fundamentan en el marcaje previo de la población problema con uno ó dos anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (fluoresceína-FITC y/o ficoeritrina-B), sobre los cuales se hace incidir célula a célula, el rayo laser. La luz dispersada al incidir el rayo sobre cada célula es recogida por el detector frontal que define el tamaño celular. La luz dispersada en sentido perpendicular es recogida por el detector en ángulo recto que analiza las células en función de su densidad ó granularidad. El análisis conjunto de la intensidad de la fluorescencia para toda la población y su representación estadística, permitirá conocer la proporción relativa de elementos marcados por cada anticuerpo así como el tamaño de los mismos y su homogeneidad citoplasmática (Braylan et al, 1982) (Coon & Weinstein, 1991).

I-7.- INTRODUCCION GENERAL AL ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES. ANALISIS DE IMAGENES DIGITALIZADAS, FUNDAMENTOS BASICOS SOBRE DIGITALIZACION Y TRATAMIENTO DE IMAGENES.

Aunque la aproximación conceptual al análisis de imágenes por ordenador es relativamente simple, los fundamentos lógicos e informáticos del proceso ya no lo son tanto.

De forma general, todo sistema de tratamiento de imágenes por ordenador consta de los siguientes elementos (Gª del Moral y O'Valle, 1992):

-- Dispositivo de captación de la imagen.

-- Procesador digital que la transforma para hacer asequible su manejo por un sistema informático A/D.

-- Dispositivo de presentación de la imagen.

-- Sistema de almacenamiento y/ó de transmisión de imágenes.

-- Ordenador que se encarga de ejecutar los programas de análisis y manipular las imágenes hasta obtener los resultados previstos.

I-7.1.- ADQUISICION DE LAS IMAGENES.

En el campo de la morfología microscópica, la captación de las imágenes se realiza mediante una cámara de televisión, el microdensitómetro ó un scanner. Todos estos instrumentos tienen en común la propiedad de medir con una fotocélula ó dispositivo similar, la cantidad de luz que porta un haz elemental transmitido por la imagen a muestrear. El resultado punto a punto de la exploración es recogido por el sensor y enviado a la tarjeta digitalizadora (Bacus & Grace, 1987).

En otras ocasiones, la luz reflejada es recogida por una cámara de televisión funcionando mediante sensores situados en celdillas independientes (sistema CCD) (Smeulders & Kate, 1987) (Ferrer-Roca, 1990).

I-7.2.- DIGITALIZACION DE LA IMAGEN.

La imagen digital, se obtiene a través de la cuantificación de la amplitud de una imagen discreta. El número de valores posibles para definir la amplitud depende del número de bits empleados en la codificación.

Esta última circunstancia no es constante para todos los sistemas de análisis ya que depende del tipo de imagen a digitalizar. En el caso de imágenes complejas con amplia gama de grises como es el caso de las histológicas o las estudiadas en morfología, se estan utilizando por convención, 8 bits para almacenar la información relativa a la iluminosidad de cada punto del objeto, por lo cual el valor máximo codificado será igual a 2^8=256. Por convención, una intensidad 0 es igual al negro mientras que el valor 255 equivale al blanco (Smeulders & Kate, 1987). Los restantes valores constituyen la escala de grises (en conjunto 256 niveles o tonos distintos), en que ha de ser convertida la luminosidad de cualquier punto de la imagen. A este proceso de conversión se denomina transformación digital (Ferrer-Roca, 1990).

I-7.3.- PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE LAS IMAGENES.

La primera intervención que puede realizarse sobre una imagen a través de un sistema de análisis automático, es la aplicación de determinados operadores que contribuyen a mejorar ó modificar algunos aspectos de la imagen inicial. Atendiendo al número de elementos de la imagen inicial que intervienen en el cálculo de cada elemento de la imagen final, pueden distinguirse (Gonzalez & Wintz, 1987):

- Operadores puntuales.
- Operadores locales.
- Operadores globales.

I-7.3.1.- Técnicas de análisis de imagen mediante operadores puntuales.

Los operadores puntuales pueden modificar pixel a pixel tanto la luminosidad (amplitud) como sus coordenadas geométricas.

Las modificaciones en la amplitud de la imagen se realizan para cumplir dos objetivos fundamentales: 1) Provocar su realce y mejorar su representación visual, por lo general aumentando el contraste; 2) Corregir alteraciones radiométricas fundamentalmente eliminando las zonas con iluminación deficiente.

El primer paso para realzar una imagen es realizar el histograma de grises de la imagen inicial. En esta representación gráfica el ordenador muestra el número de pixeles de la imagen asociados a cada uno de los 256 niveles posibles de gris, lo cual es una información sumamente útil sobre la composición digital de la imagen. Comúnmente, en el histograma aparecen picos bien definidos de los tonos de gris que predominan en la imagen, de forma que es posible seleccionar aquellos que corresponden a las estructuras de objeto de análisis.

El subsiguiente aumento del contraste se obtiene al expandir el histograma de la banda seleccionada hasta ocupar de nuevo todo el espectro posible en la imagen final, a través de un proceso denominado ecualización.

La eliminación de las sombras y artefactos producidos por una iluminación deficiente del objeto, es otra operación relativamente sencilla que está al alcance de los sistemas automáticos de análisis de imagen. Se realiza por un procedimiento análogo al anterior, de forma que primero se realiza una captura de la luminosidad del fondo y, el histograma obtenido se resta pixel a pixel a la imagen de trabajo a través de un operador puntual (Ferrer-Roca, 1990).

I-7.3.2.- Técnicas de análisis de imagen mediante operadores locales.

Este tipo de operaciones sobre las imágenes se realizan con dos objetivos fundamentales: 1) Producir un filtrado de las mismas eliminando determinadas frecuencias contaminantes (conocidas como ruidos) y 2) Provocar un realce específico de los bordes de la imagen con objeto de obtener un resultado final que sea subjetivamente más agradable.

Ambos tipos de operaciones se realizan mediante la aplicación a la imagen inicial de filtros digitales que la suavizan eliminando ruido y corrigiendo errores de transmisión (Gonzalez & Wintz, 1987) (Pratt, 1978).

I-7.3.3.- Técnicas de análisis de imagen mediante operadores globales.

Se realizan básicamente a través de la aplicación de transformaciones bidimensionales por las que se establece una relación biunívoca entre dos espacios distintos (p.e., la proyección de una imagen tridimensional en un eje de coordenadas trigonométricas ó, viceversa, la reconstrucción tridimensional de un objeto a partir del muestreo de una imagen plana (Freeman, 1961). Además con estos operadores conseguimos:

1) Extracción de información de la imagen mediante análisis matemático.
2) Reducción de la redundancia o solapamiento de bandas superpuestas en imágenes multibanda.
3) Eliminación de degradaciones de la imagen (desenfoque, defectos de curvatura..).

I-7.4.- SEGMENTACION Y CLASIFICACION DE LA IMAGEN.

El concepto de segmentación de una imagen hace referencia a la selección del componente de la misma que va a ser objeto de análisis. En la práctica, este procedimiento consiste en aplicar a la imagen un umbral de discriminación por el cual todos los pixeles situados dentro de dicho umbral son considerados como parte del objeto y el resto son tratados como ruido. En el fondo, todo se reduce a colocar los pixeles seleccionados en blanco y los rechazados en negro, por lo cual el resultado final es una imagen binaria en dos tonos (Abmayr et al, 1987).

La segmentación de una imagen puede realizarse de tres formas distintas: Interactiva, semiautomática y automática.

I-7.5.- PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN BINARIA.

Sobre una imagen segmentada pueden aplicarse, aparte de todos los operadores de imagen antes mencionados, métodos de morfología matemática cuales son (Harris et al, 1982) (Harms et al, 1986):

1) Técnicas de erosión-dilatación.

2) Esqueletización.

En la erosión de un objeto, se realiza la eliminación de la capa de pixeles situada superficialmente sobre el mismo, de forma equivalente a lo que supondría pelar un cebolla . Mediante esta manipulación, inicialmente se hace desaparecer las irregularidades más sutiles de la superficie de los objetos, por lo que la erosión se considera útil para individualizar objetos que se encuentran en contacto.

La dilatación es la función inversa a la erosión, de forma que mediante ella, se añade al objeto una capa superficial de pixeles agrandando su tamaño, con ello unimos objetos independientes ó rellenamos pequeñas oquedades de la imagen primaria.

La esqueletización de una imagen binaria consiste en reducir toda la información contenida en ella a unos ejes principales de referencia a través del adelgazamiento progresivo de la estructura a esqueletizar hasta alcanzar la configuración de una lína de un solo pixel de espesor. De esta forma un esqueleto simple y sin ramificaciones informa de una imagen de morfología secilla, y lo contrario si tenemos un esqueleto ramificado y arborescente.

I-7.6.- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS ANALITICOS.

En lo que respecta a la presentación y análisis de los resultados obtenidos mediante el estudio de imágenes digitalizadas, cualquiera de los modernos sistemas puede utilizarse para:

1) Practicar estudios de morfometría clásica sobre las imágenes segmentadas y obtener información sobre la longitud, perímetro, área, número de partículas existentes, orientación y centro de masa de los objetos problema (granulometría) (Giaretti et al, 1983).

2) Establecer criterios sobre la forma y grado de complejidad de la superficie de los objetos, incluyendo operaciones de morfología matemática que proporcionan información sobre sus relaciones, periodicidad, distribución espacial, etc. Dentro de este campo, es

posible realizar reconstrucciones volumétricas tridimensionales a partir de cortes seriados de las estructuras a valorar (estereología) (Ferrer-Roca, 1986).

3) Realizar estudios sobre la densidad óptica integrada de estructuras histológicas, como es el caso de los núcleos celulares (densitometría), en cuya base se encuentra el futuro desarrollo de sistemas para el diagnóstico citológico automático de las neoplasias malignas. En este sentido, es posible analizar la textura de la cromatina nuclear y la cantidad relativa que existe de la misma, coloreando el ADN nuclear a través de una tinción estequiométrica como es el caso de la reacción de Feulgen. De esta manera, es posible construir un histograma donde se recogen la proporción de células diploides ó aneuploides existente en una muestra problema (McCready & Papadimitriov, 1983) (Ferrer-Roca et al, 1988b).

Por analogía con la tinción de Feulgen es posible realizar estudios sobre preparaciones citológicas coloreadas con otros métodos (caso de la hematoxilina-eosina) e incluso, aplicando los correspondientes factores de corrección, sobre secciones histopatológicas. Asimismo, mediante densitometría puede realizarse cuantificación de receptores celulares medidos por técnicas de coloración inmunohistoquímica (Pressman, 1976) (Sklarew & Pertschuk, 1987) (Ferrer-Roca et al, 1988a) (por ejemplo, receptores estrogénicos en cáncer de mama, antigeno Ki-67 de proliferación celular en neoplasias malignas, receptores de superficie linfocitaria, etc.) siempre y cuando el método utilizado sea estequiométrico respecto al receptor (ó lo que es igual que por cada molécula existente de receptor tan solo se produzca la fijación inmunoquímica de una molécula de cromógeno), como es el caso de la inmunoperoxidasa indirecta con puente único (Sternbenger & Sternberger, 1986).

4) Valorar mediante colorimetría directa la tinción estructural y citológica de los tejidos, uno de cuyos ejemplos más clásicos podría ser la cuantificación de cianofilia ó eosinofilia por parte de las células superficiales en los frotis vaginales ó la valoración de tinciones hematológicas en médula ósea (Kunze et al, 1980) (Ferrer-Roca et al, 1988a) (Gª del Moral y O'Valle, 1992).

OBJETIVOS

PLAN DE TRABAJO

Nuestro trabajo ha pretendido, en primer lugar, establecer y valorar la acción "in vitro" de la CsA sobre líneas de carcinoma y melanoma en cultivo. En segundo lugar, y simultáneamente, estudiar de forma cuantitativa las posibles modificaciones producidas por la CsA sobre la expresión de la GP-170 en estas líneas celulares.

De esta manera y con el fin de diseñar un modelo que permita la testificación de drogas que puedan estar involucradas en los mecanismos detoxicantes de donde forma parte activa la GP-170, hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1.- Estudiar el comportamiento de las líneas celulares **HeLa, MCF-7, SK Mel-5 y B-16** en nuestras condiciones de cultivo, mediante la evaluación de curvas de crecimiento y fracción proliferativa, valorando por análisis de imagen las densidades ópticas integradas de sus núcleos.

2.- Establecer los efectos producidos por la CsA, en el rango de concentraciones correspondiente a los niveles terapéuticos y próximas a ellas, sobre dichas líneas celulares, cuantificando mediante el método colorimétrico del MTT (sal de tetrazolio) el efecto antiproliferativo y/ó citotóxico.

3.- Cuantificar mediante citometría de flujo las posibles modificaciones en la expresión de la GP-170 en líneas celulares expuestas y no expuestas al efecto influjo de la CsA y a distintos intervalos de tiempo.

4.- Analizar la incorporación de CsA por la célula por valoración de forma indirecta mediante radioinmunoanálisis (RIA) de los sobrenadantes tras un período fijo de incubación.

5.- Estudiar el efecto inducido por la CsA sobre los elementos celulares en cultivo mediante la valoración de parámetros morfométricos y densitométricos de análisis de imagen.

6.- En general se pretende hacer el diseño de un método global de estudio para la testificación de sustancias que, como la CsA, modifican la expresión de moléculas involucradas en los fenómenos de multirresistencia a drogas (MDR), cuantificando de forma integrada todos aquellos parámetros que puedan completar el estudio.

MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS.

II-1.- MATERIAL BIOLOGICO.

II-1.1.- LINEAS CELULARES.

Se han utilizado para este estudio dos líneas celulares de carcinoma, **HeLa** y **MCF-7** y otras dos líneas celulares de melanoma, las líneas **SK Mel-5** y **B-16** . La selección se ha realizado en base a tres puntos fundamentales:

a) Pertenecer a líneas estandarizadas en cultivos desde hace años.

b) Poseer una alta refractariedad frente a la quimioterapia convencional.

c) Tratarse de líneas de carcinoma, células de estirpe epitelial sobre las que se ha comentado efecto antiproliferativo y líneas de melanoma sobre las que se han ensayado quimioterápicos y se ha evidenciado alta resistencia a los mismos.

II-1.1.1.- Línea HeLa.

Fue la primera línea celular aneuploide, epitelial, derivada de tejidos humanos y mantenida indefinidamente por pases seriados.

Aislada por G.O. Gey, W.D. Coffman y M.T. Kubicek en 1951 de un carcinoma de cervix de una mujer de raza negra de 31 años. Mas recientemente fueron analizadas las muestras originales por Jones y colaboradores (1971) diagnosticando el tumor como un adenocarcinoma pobremente diferenciado.

Desde su origen, ha sido una de las líneas celulares más ampliamente estudiadas. Un cultivo sobre plasma coagulado fue enviado a W.F. Scherer en 1952 r anteniéndola seriadamente en cultivos en monocapa en un medio consistente en 40% de suero humano, 2% de extracto de emulsión de pollo y 58% de solución salina equilibrada de Hank. En 1958 la línea fué criopreservada y almacenada hasta 1959, siendo cultivada y congelada de nuevo hasta 1960. Después de otro cultivo y congelación fué suministrada al banco de células de los Estados Unidos (American Type Culture Collection -ATCC-; Rockville, Maryland) en noviembre de 196', aproximadamente en el pase 76-88, comprobándose que la mayoría de las características de la línea en estos momentos eran semejantes a las células descritas en los estudios clásicos de

Scherer, Syverton y Gey en 1953.

Suministrada a nuestro laboratorio por el Dr. A. Osuna del Dpto. de Parasitología Molecular de la Facultad de Ciencias de Granada, en un número de pase desconocido debido a la gran difusión de la línea e intercambios entre centros de investigación.

Posee como características en cultivo (Ilustración 1), su rápida proliferación con un alto índice mitótico; su morfología poligonal sin desarrollar sistemas de uniones específicos entre los elementos celulares. En condiciones normales no se observan signos de citopatogenicidad.

II-1.1.2.- Línea MCF-7.

Esta línea celular fué establecida por H.D. Soule y colaboradores en 1973 a partir del derrame pleural maligno de una mujer postmenopáusica con infiltración metastásica de carcinoma ductal infiltrante de mama.

Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuido a que se trata de la primera línea celular documentada que posee receptor estrogénico positivo (Broocks et al, 1973) y responde a cambios metabólicos y estructurales mediados por la acción de los estrógenos (Bonney et al, 1985).

La línea celular **MCF-7** posee, además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre ellos: andrógenos progestágenos, glucocorticoides, vitamina D_3, hormonas tiroideas, prolactina, insulina y calcitonina, así como factores estimuladores del crecimiento celular (Engel & Young, 1978) (Horwitz et al, 1978). Esta línea celular ha mantenido también otras características del epitelio mamario diferenciado como es su capacidad para formar estructuras organoides (esferoides).

Un cultivo en el pase 138 se donó a la ATCC por C.M. Mc Grath en 1982 y al analizar la línea comunicaron que puede contener información vírica (virus tipo B ó C) y que al ser manejada, puede ser un agente potencialmente contaminante.

Fué cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Olea del Departamento de Radiología de la Facultad de Medicina de Granada en el pase 540.

El adenocarcinoma que dió origen a esta línea correspondía a una mujer de 69 años, raza blanca y grupo sanguíneo O, Rh +.

Posee como características en cultivo (Ilustración 2), crecer en monocapa formando clonas íntimamente adheridas de morfología poligonal, sin llegar a desarrollar estructurales tumorales.

II-1.1.3.- Línea SK Mel-5.

La línea **SK Mel-5**, pertenece a una extensa ser ; de líneas de melanomas. Aislada en .974 por T. Takahashi y colaboradores, del Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Carey et al, 1976), fué suministrada a la ATCC en el decimosegundo subcultivo, siendo remitida a nuestro laboratorio en el pase 26.

El melanoma que dió origen a esta línea, correspondía a una mujer de 24 años, raza blanca y grupo sanguíneo O, Rh -.

Posee como características en cultivo (Ilustración 3), el ser pigmentada, adoptar morfología estrellada y desarrollar melanoma maligno en ratones atímicos.

II-1.1.4.- Línea B-16.

Fué establecida por I.J. Fidler (1962) del NCI - Frederick Cancer Research Center, a partir de un melanoma murino de origen espontaneo.

Cedida a nuestro centro en 1986 por el Dr. G. Barry Pierce del Health Sciences Center, School of Medicine. Universidad de Colorado (E.E.U.U.).

Posee como características el ser pigmentada, adquirir morfología variable, con células estrelladas y fusiformes de pequeño tamaño (Ilustración 4), y ser fácilmente transplantable a ratones singénicos de la cepa C57BL/6.

Se desconoce el número de subcultivos realizados en esta línea, quizás debido a su amplia difusión mundial.

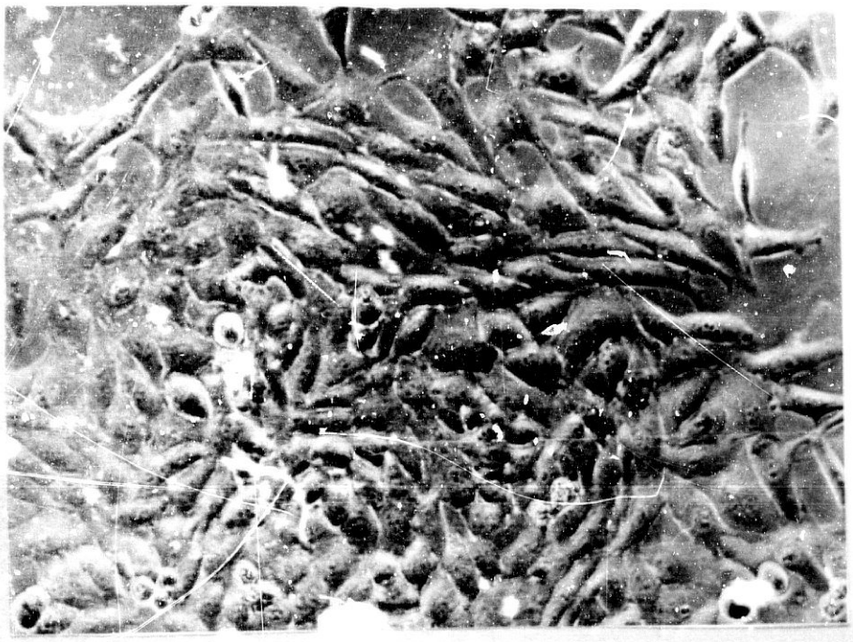


Ilustración 1. Línea celular HeLa en la fase de crecimiento logarítmico. Nótese su morfología poligonal sin desarrollar sistemas de uniones específicos entre los elementos celulares.

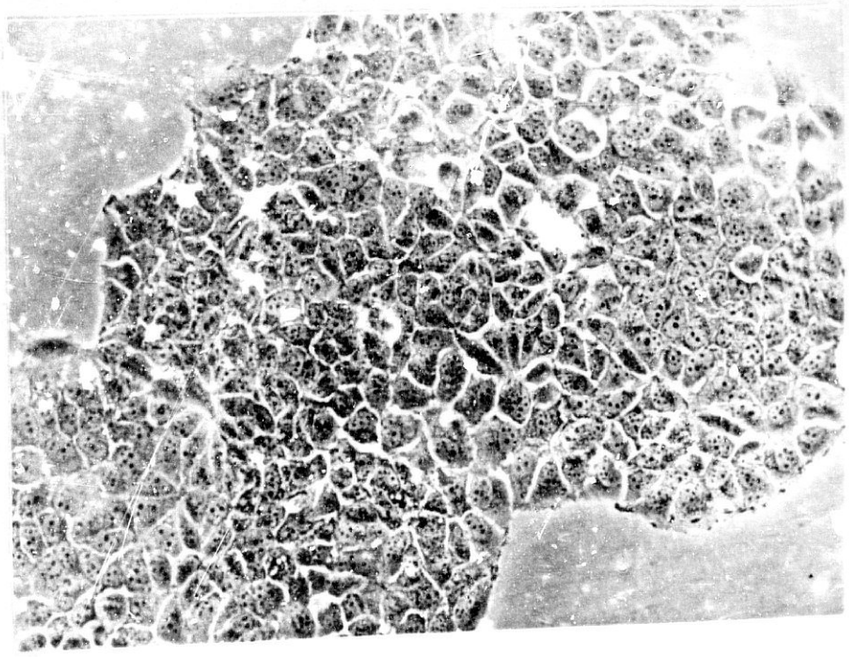


Ilustración 2. Línea celular MCF-7 en la fase de crecimiento logarítmico. Obsérvese las clonas íntimamente adheridas de morfología poligonal.

Ilustración 3. Línea celular SK Mel-5 en la fase de crecimiento logarítmico. Nótese la menor tasa de células en división, que justifica su mayor tiempo de duplicación.

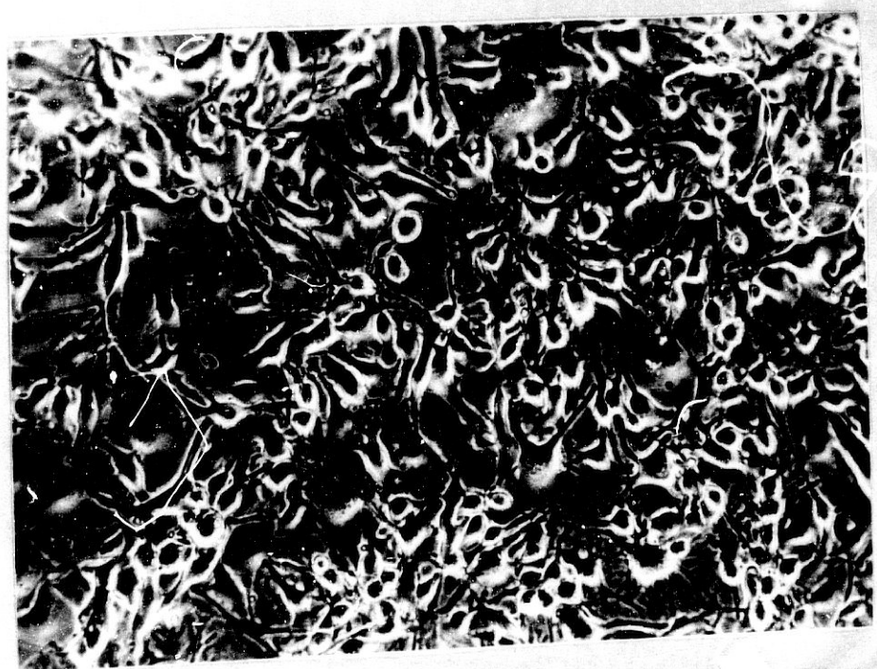


Ilustración 4. Línea celular B-16 en la fase de crecimiento logarítmico. Es evidente el alto índice de células en proliferación que adoptan la característica redondeada y con un halo birrefringente.

II-2.- FARMACO ENSAYADO.

Hemos empleado en este trabajo el fármaco CsA, sustancia base cedida por los laboratorios SANDOZ S.A.E. y ciclosporina en estado de clorhidrato (CsA DCL) (Sandimmun^R, SANDOZ) de idéntica procedencia y preparado para uso clínico intravenoso.

Las disoluciones de CsA en polvo han sido preparadas mediante pesada en balanza de precisión haciendo una predilución en etanol de 96º a concentración 10 mg/ml de etanol y almacenada a -30ºC. A partir de ésta, se realizan disoluciones sucesivas en medio de cultivo MEM (Minimum Esential Medium) suplementado con 5% de suero bovino fetal inactivado (SBFI) v/v, hasta obtener las concentraciones de 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,01 µg/ml, rango que se adecúa a las concentraciones referidas en la literatura.

Igualmente, las disoluciones de CsA Sandimmum^R han sido realizadas con medio MEM (5% SBFI, v/v) y en el mismo rango de concentraciones.

La preparación de las disoluciones de trabajo de CsA se efectuó en el momento de su incorporación a los cultivos y fueron esterilizadas por filtración a través de filtros Sterivex-Gs (MILLIPORE) de 0,22 µm de poro.

II-3.- MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE LINEAS CELULARES EN NUESTRO LABORATORIO.

El procedimiento general para mantener los cultivos celulares, es bien la criopreservación a -70ºC ó los subcultivos sucesivos.

II-3.1.- CULTIVO CONTINUO DE CELULAS.

El medio utilizado para el cultivo de las células es el medio MEM suplementado con SBFI al 5% v/v, al que se añade 100 U.I./ml de Penicilina G sódica, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina con objeto de evitar las posibles contaminaciones bacterianas. El medio de cultivo se esteriliza por filtración a través de filtros Sterivex-Gs (MILLIPORE) de 0,22 µm de poro. Los frascos que contienen el medio de cultivo, se almacenan a 4ºC y se prueba su esterilidad mediante siembra de placas de agar sangre.

El cultivo de células se inicia inoculando en frascos Roux, 1 ml de suspensión de 10^5 células/ml, en medio de cultivo. A estos frascos que contienen dicho inóculo inicial, se les adiciona 5 ml de medio de cultivo, renovándolo periódicamente cada dos días y se dejan incubar en una estufa termorregulada (FORMA SCIENCE) a 37º C, enriquecida con 5% de CO_2.

Una vez completada la monocapa en la base de los frascos de cultivo, se procede a la disgregación de la misma con EDTA (líneas celulares **HeLa, SK Mel-5 y B-16**) ó EDTA-Tripsina (línea celular **MCF-7**).

- Preparación de la solución EDTA.

Para la separación de las células en monocapa se prepara una solución de EDTA constituida por: Sal sódica EDTA (MERCK) - 200 mg, GLUCOSA - 1000 mg, Cloruro Potásico - 400 mg, Cloruro Sódico - 8000 mg, bicarbonato - 380 mg, agua desionizada - 1000 ml. Ajustado a pH 7,2.

Una vez disueltos los componentes con ayuda de un agitador magnético, se esteriliza la solución por filtración. La solución filtrada se pasa mediante pipeteo estéril a frascos de tapón de rosca estériles, y se almacena a -20ºC. Cuando se va a utilizar se descongela al baño maría termorregulado a 37ºC, añadiéndose a la monocapa celular.

- Preparación de la solución EDTA-Tripsina.

Para la separación de las células en monocapa se prepara una solución de EDTA-tripsina constituida por los mismos componentes indicados en la solución de EDTA más 1.25 g de tripsina, procediendo para su preparación de la misma manera.

- Separación de la monocapa celular.

Cuando las células han formado una monocapa, es preciso proceder a su separación. Para ello, una vez retirado el medio de cultivo celular, se añaden 5 ml aproximadamente de la solución EDTA ó bien EDTA-tripsina, dejándose en contacto con las células 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se retira esta solución y los frascos se llevan a un incubador automático de CO_2 a 37ºC durante 5 minutos.

La pequeña cantidad de EDTA ó EDTA-tripsina retenida por la monocapa celular actua sobre estas durante el tiempo de incubación. Al final de este periodo, se comprueba por observación al microscopio de contraste de fase, si las células se han despegado de la superficie

del frasco en el que estaban adheridas. En caso de ser así, se añaden 5 ml de medio de cultivo y se agita muy bien la suspensión, para que de esta forma, las células se repartan uniformemente en la misma.

A continuación, tras contar el número de células/ml y calcular la viabilidad (Mediante tinción con el colorante vital Azul Tripan al 0.1%), se ajusta a 10^5 células/ml inoculándose 1 ml de esta suspensión en cada frasco, completando el volumen (hasta 5 ml) con medio de cultivo fresco.

II-3.2.- CRIOPRESERVACION.

Este método de mantenimiento parte de los cultivos en monocapa que son separados estérilmente (técnica ya descrita en el epígrafe anterior), con el fin de que las células se despeguen del sustrato sobre el que están adheridas. Una vez despegadas las células, se añade medio MEM con un 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) hasta formar una suspensión celular cuya concentración sea finalmente de 10^5 - 10^6 células/ml.

Esta suspensión celular es pasada a viales de plástico (NUNC) de cierre hermético de 1,8 ml de capacidad. Los viales son sometidos a continuación a un enfriamiento progresivo: 2 horas a 4ºC, seguidos de 2 horas a -20ºC, 24 horas introducidos en un arcón congelador FORMA SCIENCE regulado a -70ºC y finalmente llevados a nitrógeno líquido en un contenedor DX36A (Air liquide France).

Cuando se necesita utilizar estas células de nuevo, basta con descongelarlas rápidamente, para evitar recristalizaciones intracelulares que dañarían las células, sumergiendo los viales en baño maría termorregulado a 37ºC.

Tras la descongelación de los viales, y en un ambiente estéril, la suspensión contenida en los mismos se pasa a tubos "Steriline" de fondo cónico, centrifugando a 636 g durante 10 minutos, después de haberles añadido el doble de su volumen de medio MEM enriquecido con un 20% v/v SBFI.

El sobrenadante obtenido, después de esta centrifugación, es desechado, volviéndose a resuspender el botón celular en medio MEM, hasta que la concentración final sea de 10^5 células/ml. Esta nueva suspensión celular se vierte sobre frascos de cultivo Roux de 25 cm^2 de superficie, que se introducen para su incubación en una estufa a la temperatura y atmósfera de CO_2 antes mencionada.

Aproximádamente a las 4-6 horas de cultivo, las células comienzan a adherirse al frasco y multiplicarse hasta formar una monocapa.

II-3.3.- CULTIVO DE CELULAS EN PLACAS DE MICROTITULACION.

Las células procedentes de cultivos mantenidos en el laboratorio se tripsinizan y se adicionan homogéneamente a los microreceptáculos de placas de microtitulación (NUNCLON). Se inoculan 100 µl de una suspensión de células en el medio de cultivo conte do aproximadamente 2.500 células/100 µl,con la ayuda de un dosificador pipettman (GI.), a cada microreceptáculo. Las placas se incuban durante 24 horas en estufa termorregulada a 37ºC con atmósfera húmeda enriquecida con un 5% de CO_2 sellando con una banda de plástico (PARAFILM) el perímetro de la placa. Transcurrido el periodo de incubación, se comprueba la adherencia de las células al sustrato y sus condiciones de esterilidad con ayuda de un microscopio invertido y se completan los pocillos añadiendo 100 µl de medio MEM 5% SBFI v/v a cada uno de ellos.

II-4.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACION CELULAR EN CULTIVO.

Para establecer la capacidad de crecimiento de las líneas estudiadas, **HeLa, MCF-7, SK Mel-5** y **B-16** se procedió a partir de los cultivos celulares mantenidos en condiciones estándar, sembrando en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 2500 células/pocillo (10 réplicas por línea y día). El primer cambio de medio se realizó al séptimo día de la siembra y a partir de aquí se realizaron cambios periódicos cada dos días. La testificación se realizó en todos los casos mediante la técnica colorimétrica de MTT (como se especifica en el apartado II.5.2).

II-5.- SCREENING DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO SOBRE MICROCULTIVOS MEDIANTE TECNICA COLORIMETRICA (MTT).

En los ensayos encaminados a determinar el efecto antiproliferativo de la CsA a distintas concentraciones, hemos utilizado una técnica colorimétrica basada en la reducción del MTT (cuyo fundamento quedó explicitado en el apartado I-2.1. de la Introducción).

Se sigue el protocolo establecido por el Laboratorio de Oncología experimental del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de Granada.

II-5.1.- REACTIVOS.

3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazolium bromida, MTT (REF. M2128, SIGMA)

Disoluciones de MTT:

-Disolución stock de MTT: 10 mg MTT/ml de PBS.

Preparar en el momento de su uso ó almacenar en oscuridad a -20ºC ó a 4ºC pero nunca más de un mes.

-Disolución de trabajo de MTT: Diluir a 5/6 la solución stock en medio de cultivo MEM sin suero, (1 ml de solución stock + 0,2 ml de MEM sin suero) con una concentración final de 8,3 mg MTT/ml de disolución.

II-5.2.- DESCRIPCION DE LA TECNICA.

1º.- Sembrar sobre placas de microtitulación (NUNC) de 96 pocillos con fondo plano, 2500 células/pocillo de las líneas **HeLa, MCF-7, SK Mel-5 y B-16.**

2º.- Dejarlas adherir al sustrato, manteniéndolas durante 24 horas a 37ºC en estufa de CO_2.

3º.- Añadir a los pocillos correspondientes, 100 µl de las disoluciones de CsA a doble concentración de las deseadas para que las concentraciones finales sean 5, 1, 0,5, 0,1, 0,01 µg/ml de CsA en medio MEM (SBFI, 5% v/v). Incubar durante 6 días en estufa termorreguladora a 37ºC.

4º.- Sustraer el medio y añadir 200 µl de medio MEM fresco (sin suero ni antibióticos) y 30 µl de la disolución de trabajo de MTT en cada pocillo.

5º.- Incubar durante 4 horas a 37ºC en estufa de CO_2.

6º.- Extraer el medio y el MTT no reducido con la micropipeta multicanal Titertek Plus (FLOW)

7º.- Añadir en cada pocillo 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) puro.

8º.- Mantener en agitación durante 15-30 minutos a temperatura ambiente.

9º.- Proceder a su lectura colorimétrica a 492 nm con un espectrofotómetro Multiskan PLUS MK 11 (TITTERTEK), preparado para el registro simultaneo de los 96 pocillos en pocos segundos.

II-5.3.- CONTROLES.

Se han establecido los siguientes controles:

-10 pocillos con células en medio MEM (SBFI, 5 % v/v) y etanol a la máxima concentración empleada en las disoluciones de CsA en medio de cultivo.

-10 pocillos con células no expuestas a la droga, tomados como valor de referencia.

-Al realizar el paso 8º de la técnica se añade DMSO a una serie de pocillos vacíos, con el fin de conocer la absorbancia debida a dicho reactivo, estos valores son tomados como blanco por lo que se sustraen a todos los valores de absorbancias.

-En los ensayos realizados con CsA Sandimmum se ponen pocillos con células en medio MEM (SBFI, 5% v/v) y aceite de ricino polioxietilado (Cremophor) a la mayor concentración que se encuentra incorporado en las disoluciones de CsA.

II-5.4.- ELABORACION DE LA CURVA PATRON.

Para poder traducir los valores de absorbancias a un número concreto de células y conocer el grado de reducción particular del MTT para las líneas celulares ensayadas, se elaboró una curva patrón para cada una de las experiencias realizadas procediéndose de la siguiente manera:

1º.- Preparar una suspensión celular que contenga 160.000 células en 200 µl de medio MEM (SBFI, 5 % v/v) para cada una de las líneas celulares, mediante contaje en la cámara de Neubauer.

2º.- Previamente, añadir en una placa de microtitulación (NUNC) de 96 pocillos con fondo plano, 100 µl de medio de cultivo en todos los pocillos excepto en los primeros y últimos de cada una de las columnas que quedarán con 100 µl de volumen final según el sistema de diluciones adoptadas.

3º.- Incorporar en los primeros pocillos de las diferentes filas, 200 µl de medio MEM con 5 % de SBFI conteniendo 160.000 células de las distintas líneas celulares. Se toman 100 µl de este primer pocillo y se añaden al siguiente, del cual se toman 100 µl y se vierten en el siguiente y así sucesivamente hasta completar la serie de pocillos. De esta forma el número de células del primer al séptimo pocillo de cada fila será 80.000, 40.000, 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 y 1.250 para cada una de las líneas celulares.

4º.- Esperar 4 horas para que se sedimenten y adhieran las células al sustrato, incubando a 37ºC en estufa de CO_2.

5º.- Cuantificar mediante ensayo con MTT según el método propuesto (puntos del 4º al 9º de la técnica descrita en el apartado II-5.2).

II-6.- DETERMINACION DE LA EXPRESION DE LA GLICOPROTEINA DE MEMBRANA (GP-170) MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO (CF).

II-6.1.- MUESTRAS.

Se ha estudiado la expresión de la glicoproteína de membrana P-170 sobre líneas celulares de origen humano, **HeLa, MCF-7** y **SK Mel-5** y de origen murino **B-16**, tratadas y no tratadas con CsA a concentraciones de 0,5 y 1 µg/ml de CsA en medio MEM (5% SBFI, v/v) a 7 y 30 días de exposición.

II-6.2.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

II-6.2.1.- Reactivos.

-Se utilizó un Kit comercial, P-Glycochek C-219 FITC (CENTOCOR) que contiene un AcMo de ratón C-219 (IgG_1) marcado con Isotiocianato de fluoresceina específico para uno de los epitopos de la GP-170 y como control un AcMo de ratón para un epitopo de tamaño equivalente (IgG_1) marcado con isotiocinato de fluoresceina que no se une al determinante antigénico detectado por el AcMo C-219.
-Suero normal de ratón (DAKO) para minimizar la fijación inespecífica del anticuerpo.
-Albúmina bovina (BSA) (SIGMA).

II-6.2.2.- Descripción de la técnica.

1º.- Sembrar 62.500 células por frasco de cultivo Roux de 25 cm^2 de superficie. Preparar tres frascos por línea celular a ensayar. Añadir medio MEM (SBFI, 5% v/v) hasta completar 5 ml. Mantener en cámara termorregulada a 37ºC y 5% de CO_2.

2º.- Retirar el medio de cultivo a las 24 horas. Etiquetar los frascos que van a ser tratados con CsA (0,5 y 1 µg/ml) del control celular que no será tratado. Añadir 5 ml de medio MEM (SBFI, 5% v/v) a este último y la misma cantidad de las disoluciones de CsA 0,5 y 1 µg/ml en medio MEM con 5% v/v SBFI en los frascos correspondientes. Incubar en la estufa a la temperatura y atmósfera de CO_2 antes mencionadas.

3º.- Mantener el ensayo con CsA durante los días de la experiencia cambiando cada 48 horas los medios de cultivo, según se indica en el apartado anterior.

4º.- Despegar las células con solución de EDTA (líneas celulares **HeLa, SK Mel-5, B-16**) ó EDTA-Tripsina (línea celular **MCF-7**). Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

5º.- Para cada una de las concentraciones de CsA ensayadas y controles de las diferentes líneas celulares, ajustar el botón celular a 10^6 células/ml mediante contaje en la cámara de Neubauer. Trabajar inicialmente con 2 ml de suspensión celular. Centrifugar.

6º.- Resuspender las células en 2 ml de metanol frio al 70% e incubar durante 5 minutos a -20ºC para permeabilizar las membranas celulares. Centrifugar.

7º.- Lavar las células con 2 ml de PBS, dos veces centrifugando a 1500 r.p.m. y 4ºC durante 5 minutos cada vez.

8º.- Comprobar la eficacia, de la fijación por tinción de una alícuota celular con azul tripan 0,1% p/v. Si todas las células no están teñidas la permeabilización se debe considerar incorrecta.

9º.- Ajustar la densidad celular a 10^6 células/ml. Trabajar con 1 ml.

10º.- Resuspender en PBS conteniendo proteínas bloqueantes (BSA 1% p/v y suero de ratón 10% v/v). Incubar durante 60 minutos a 4ºC en cámara húmeda.

11º.- Añadir a 100 µl de cada una de las suspensiones celulares, 10 µl de AcMo P-Glycochek C-219 FITC (CENTOCOR). Incubar durante 60 minutos a 4ºC y en oscuridad agitando suavemente los tubos cada 15-20 minutos. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

12º.- Lavar las células 2 veces con 1 ml de PBS conteniendo proteínas bloqueantes (PBS-EDTA 0,05% p/v + BSA 1% p/v) centrifugando a 1500 r.p.m. durante 5 minutos y temperatura ambiente.

13º.- Resuspender los botones celulares en 1 ml de PBS.

14º.- Analizar las suspensiones celulares en el citómetro de flujo dentro de las 18 horas siguientes. Si no fuese así, almacenar en oscuridad a 4ºC.

II-6.2.3.- Controles de la técnica.

-Controles negativos: Constituidos por suspensiones celulares tratadas y no tratadas con CsA, para cada línea celular y dosis, incubadas exclusivamente con PBS.
-Controles internos: Suspensiones celulares tratadas y no tratadas con CsA para cada línea celular y dosis, incubadas con el AcMo primario P-Glycochek FITC dirigido frente al epitopo no reactivo.

II-6.2.4.- Lectura de resultados.

La emisión de fluorescencia fué determinada mediante un citómetro de flujo Cytoron (ORTHO) tras finalizar la técnica (dentro de las 18 horas siguientes) contabilizando durante 60 segundos el número de células que interrumpen el haz del láser de argón.

Las reacciones positivas son medidas por la intensidad de fluorescencia y/ó el número de células reactivas de la serie incubadas con el AcMo P-Glycochek C-219 que pasan por él. La fluorescencia resultante del AcMo control se considera como tinción de fondo.

La lectura de resultados se estableció los días 7 y 30 de la experiencia.

II-6.3.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

II-6.3.1.- Reactivos.

- Antisuero primario: Se empleó el AcMo JSB-1 (P-170 Glycoprotein MDR SANBYO) ó bien el AcMo C-219 P-Glycochek (CENTOCOR).
- Antisuero secundario: αIgG de cabra conjugada con FITC (ORTHO) frente a ratón.
- Ig G isotípica de ratón (ORTHO).
- AcMo frente a queratinas de alto y bajo peso molecular -coctel panqueratínico- (Antikeratin Primmary Mouse MAb (INMUNOSTAIN)).
- Suero normal de cabra (DAKOPATTS).
- BSA (SIGMA)

II-6.3.2.- Descripción de la técnica.

1º al 9º pasos de la técnica de inmunofluorescencia directa.

10º.- Resuspender en PBS conteniendo proteínas bloqueantes (BSA 1% p/v y suero normal de cabra 10% v/v) incub durante 60 minutos a 4ºC en cámara húmeda.

11º.- Añadir a 200 µl de cada una de las suspensiones celulares, 200 µl del AcMo JSB-1 (SANBYO) dilución 1/20 ó bien 200 µl del AcMo C-219 (CENTOCOR) dilución 1/20. Incubar 60 minutos a 4ºC en cámara húmeda.

12º.- Lavar las células dos veces con 1 ml de PBS conteniendo proteínas bloqueantes (PBS-EDTA 0,05 % p/v + BSA 1 % p/v) mediante centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 minutos y temperatura ambiente.

13º.- Añadir directamente sobre los botones celulares 100 µl de αIgG-FITC (ORTHO) agitando posteriormente e incubar durante 30 minutos a 4ºC y en oscuridad.

14º.- Lavar las células con 1 ml de PBS, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

15º.- Resuspender los botones celulares en 1 ml de PBS.

16º.- Analizar las suspensiones celulares en el citómetro de flujo dentro de las 18 horas siguientes. Si no fuese así, almacenar en oscuridad a 4ºC.

II-6.3.3.- **Controles de la técnica.**

-Como controles negativos se utilizan las suspensiones celulares tratadas y no tratadas con CsA incubadas con PBS para cada línea celular y dosis ensayada.
-Como control interno se utilizan suspensiones celulares tratadas y no tratadas con CsA incubadas con AcMo frente a queratina dilución 1/10 y como control negativo AcMo isotípico de ratón dilución 1/40, para cada una de las líneas celulares y dosis.

II-6.3.4.- **Lectura de resultados.**

La emisión de fluorescencia fué determinada mediante un citómetro de flujo Cytoron (ORTHO), dentro de las 18 horas siguientes de finalizada la técnica, contabilizando durante 60 segundos el número de células que interrumpen el haz del laser de argón.

Las reacciones positivas pueden ser medidas por la intensidad de fluorescencia y/ó el número de células reactivas de la serie incubadas con el AcMo JSB-1 ó bien el AcMo C-219 en el canal de fluorescencia verde.

La lectura de resultados se estableció a los 7 y 30 días de la experiencia.

II-7.- DETERMINACION DE CsA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

El método utilizado para determinar las concentraciones reales de CsA en los medios de cultivo, ha sido el suministrado por la casa INCSTAR, denominado CYCLO-TRAC NS RIA, que mide cuantitativamente CsA y metabolitos por radioinmunoensayo (RIA), que brevemente describimos.

II-7.1.- REACTIVOS.

1.- Solución diluyente: Es un tampón fosfato que contiene estabilizadores y surfactantes. Para prepararlo, se diluye el contenido de un vial con 280 ml de agua destilada y desionizada, mezciándola bien.
2.- Cyclo-trac NSB Inmunosep (azul): Mezcla 1:1 de suero de asno antirratón y suero normal de ratón, diluido en fosfato salino que contiene ázida sódica y surfactantes. Se le añade color azul.
3.- Cyclo-trac NS sangre total. Estándar 0: suero humano sin ciclosporina, con ázida sódica y otros estabilizadores. No es necesaria su reconstitución.

4.- Cyclo-trac NS sangre total. Estándar (A-E): Cinco concentraciones estándar de CsA con rango entre 60-3000 ng/ml son prediluidas en suero humano que contiene ázida sódica y otros estabilizadores.

5.- Anti-Cyclo-trac NS InmunoSep: El suero monoclonal de ratón anticiclosporina y mezcla 1:1 de suero de asno antirratón con suero normal de ratón, son primeramente diluidos er tampón fosfato salino que contiene ázida sódica y surfactantes. No es necesaria su reconstitución.

6.- I-125 Cyclo-trac NS (verde): Ciclosporina marcada con I-125 (el material radioactivo no sobrepasa los 10 microcurios) y diluidos en tampón fosfato salino que contiene ázida sódica y surfactantes. Se le añade color verde.

7.- Cyclo-trac NS sangre total. Control. (Nivel 1 y 2): suero humano con una cantidad conocida de ciclosporina para obtener una concentración con un rango específico. Lleva ázida sódica y otros estabilizadores.

II-7.2.- DESCRIPCION DE LA TECNICA.

1.- Sembrar sobre placas de microtitulación (NUNC) de 96 pocillos con fondo plano, 2500 células/100 µl de las líneas **HeLa, MCF-7, SK Mel-5 y B-16.**

2.- Dejarlas adherir al sustrato plástico manteniéndolas durante 24 horas a 37 ºC en estufa de CO_2.

3.- Añadir 100 µl de medio MEM (SBFI 5% v/v) a los pocillos con células sin tratar y la misma cantidad de las disoluciones de CsA 0,5 y 1 µg/ml en el mismo medio, a los pocillos correspondientes. Mantener durante 6 días en estufa termorreguladora a 37 ºC.

4.- Sustraer los medios de cada uno de los pocillos (200 µl) mediante dosificador automático pipettman (GILSON) y verter en tubos Eppendorf.

5.- Almacenar las muestras de sobrenadantes como mínimo durante dos horas en un congelador a -40ºC, hasta el momento de su determinación.

6.- Descongelar cada muestra y esperar que alcancen la temperatura ambiente (18-20ºC).

7.- Tomar 50 µl de cada estándar, control y muestras problema, colocándolas en los tubos previamente etiquetadas (de 12x75 mm.).

8.- Añadir 2,5 ml de la solución diluyente de muestra en cada tubo.

9.- Homogeneizar las muestras mediante agitador manual (GRISEL).

10.- Poner cada tubo de vidrio por duplicado y añadir los reactivos y la cantidad de ellos según la tabla siguiente

	Cuenta total	NSB	CsA estándar ng/ml						Control y muestras		
			0	A	B	C	D	E	1	2	3
nº de tubos	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22
Estándar 0 diluido		50	50								
Estándar diluido				50	50	50	50	50			
Solución diluyente									50	50	50
CYCLO-Trac NS	100 µl										
CYCLO-Trac NS NSB ImmunoSep	1000 µl										
Anti-CYCLO-Trac NS ImmunoSep	1000 µl										

11.- Homogeneizar las muestras mediante agitador manual e incubar 2 horas a 20-25ºC.

12.- Centrifugar durante 20 minutos a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

13.- Con la trompa de vacio, aspirar el sobrenadante y dejar el botón.

14.- Proceder a su lectura.

II-7.3.- CONTROLES.

Se utilizan como controles de las dosis de CsA adicionadas a los pocillos, alícuotas de las disoluciones 1 y 0,5 µg/ml de CsA en medio MEM (5% SBFI, v/v) preparadas el primer día de la experiencia y almacenadas a -40ºC en un arcón congelador Forma (SCIENCE).

II-7.4.- LECTURA DE RESULTADOS.

Fue registrada por el contador gamma (BECKMAM) con un tiempo de lectura por muestra de 1 minuto. Con las disoluciones estándar de CsA se obtiene una curva patrón que comparamos con la curva control suministrada por la casa comercial. El programa del contador gamma calcula los valores de las muestras problema extrapolándolos de la curva patrón.

II-8.- ANALISIS DE IMAGEN

II-8.1.- REACTIVOS.

- Hematoxilina ácida de Mayer.

Hematoxilina.....	1 g
Agua destilada	1000 ml
Disolver y añadir:	
Iodato sódico	0,2 g
Alumbre potásico (12 H_2O)	50,0 g
Hidrato de cloral	50,0 g
Acido cítrico (2 H_2O)	1,0 g

La solución se puede usar inmediatamente.

II-8.2.- MATERIAL.

-Imagen Real: A partir de células correspondientes a todas las líneas celulares testificadas, asi como células no neoplásicas procedentes de un primocultivo en el 5º-6º pase, extendidas sobre portas y coloreadas con colorante nuclear (Hematoxilina de Mayer), tras ser mantenidas en cultivo 7 días en contacto con CsA a las concentraciones de 0.5 y 1 µg/ml.

-Sistema de captación de imagen: Mediante cámara de video tipo CCD modelo BCD-700 (VIDAMAX), adaptada a un microscopio Olimpus BH2 dotado de lámpara halógena de 50 w.

-Sistema de almacenamiento informático: Discos de 3"1/5 de 2 Mb.

-Soporte físico del sistema de análisis digital:

. Ordenador COMPAQ (DESKPRO 386/25e) con microprocesador 80386, disco duro de 80 Mb y magnetoóptico incorporado de 650 Mb de memoria masiva por disco.

. 2 Monitores color de alta resolución VGA (COMPAQ) y EGA (IDEK Liyama).

. Impresora PINWRITER P30 (NEC)

-Soporte Lógico:

. Programa informático de análisis de imagen TEXCAN versión TC-3.1P (MICROPTIC).

II-8.3.- PROCEDIMIENTO TECNICO.

1º.- Despegar las células del sustrato plástico como se ha especificado en el apartado II-3.1 de Material y Métodos, y centrifugar a 2000 r.p.m. 10 minutos.

2º.- Fijar en metanol, durante 5 minutos.

3º.- Extender en portaobjetos previamente adicionados con gelatina-alumbre de cromo para favorecer la adhesión celular.

4º.- Teñir exclusivamente el núcleo mediante hematoxilina de Mayer, durante 5 minutos (tiñendo simultáneamente todas las preparaciones a evaluar). Deshidratar y montar.

5º.- Captar la imagen real mediante microscopio con el objetivo de 40x y lente intermedia de 3.3x conectada a una cámara de video CCD.

6º.- Adquisición, mediante ventana interactiva, de 25 imágenes independientes por archivo, con el programa informático de análisis de imagen TEXCAN, contabilizando un total de 100 núcleos por extendido citológico.

7º.- Transformar en imagen digital (255 niveles de gris) (DOI: Densidad óptica integrada)

8º.- Almacenar en discos ópticos con una extensión por imagen de 20000 bytes de memoria. (Archivos con extensión DAT)

9º.- Segmentar y umbralizar las imagenes captadas.

10º.- Almacenar en el subdirectorio del programa informático de análisis de imagen.

11º.- Recuperar la imagen captada (imagen digitalizada) y visualizar con el programa de análisis de imagen TEXCAN.

12º.- Cuantificar los parámetros deseados: MORFOMETRICOS, DENSITOMETRICOS, GRANULOMETRICOS.

13º.- Exportación de resultados al programa informático de estadística SIGMA II.

II-8.4.- CONTROLES.

-Células de cada una de las líneas celulares mantenidas en las mismas condiciones de cultivo, pero sin exposición a la droga.

-Células obtenidas de tejido no neoplásico, en el pase 5º-6º (células RSO1).

II-9.- MEDIOS EMPLEADOS.

Solución PBS

- NaCl	8,00 g
- KCl	0,20 g
- Na_2PO_4. 7 H_2O.	2,20 g
- KH_2PO4...	0,16 g
- H_2O desionizada	1000 ml

- pH final de la solución = 7,2.

Solución EDTA

- EDTA disódico	0,20 g
- Glucosa	1,00 g
- NaCl	8,00 g
- KCl	0,40 g
- $NaHCO_3$	0,38 g
- H_2O desionizada	1000 ml

- pH final de la solución = 7,2.

Solución EDTA-Tripsina

- EDTA disódico	0,20 g
- Tripsina	1,25 g
- Glucosa	1,00 g
- NaCl	8,00 g
- KCl	0,40 g
- $NaHCO_3$	0,38 g
- H_2O desionizada	1000 ml

- pH final de la solución = 7,2.

Medio MEM (Minimun Essential Medium,Eagle. GIBCO)

- NaCl	6800,00 mg
- KCl	400,00 mg
- NaH_2PO_4. H_2O	140,00 mg
- $MgSO_4$. 7 H_2O	200,00 mg
- $CaCl_2$ (anhidro).	200,00 mg
- Glucosa	1000,00 mg
- L-Arginina..	105,00 mg
- L-Cisteina..	24,00 mg
- L-Glutamina.	292,00 mg
- L-Histidina.	31,00 mg
- L-Isoleucina	52,50 mg
- L-Leucina	52,40 mg
- L-Lisina	58,00 mg
- L-Metionina.	15,00 mg
- L-Fenilalanina.	32,00 mg
- L-Treonina	48,00 mg
- L-Triptófano	10,00 mg
- L-Tirosina	36,00 mg
- Valina..	46,00 mg
- Colina Cl..	1,00 mg
- Acido Fólico	1,00 mg
- I-Inositol	2,00 mg
- Nicotinamida	1,00 mg
- D-Pantotenato Ca	1,00 mg
- Piridoxal H Cl	1,00 mg
- Riboflavina	0,10 mg
- Tiamina H Cl	1,00 mg
- Rojo Fenol	10,00 mg
- $NaHCO_3$	2200,00 mg
- H_2O desionizada.	1000,00 ml
- Penicilina G Sódica.	56,00 mg
- Sulfato de Estreptomicina.	100,00 mg
- pH final de la solución = 7,3.	

II-10.- OBSERVACIONES DE CARACTER GENERAL.

Todos los medios empleados se prepararon con agua bidestilada y desionizada, mediante sistema de cartuchos de carbón activo y resinas sintéticas Milli-Q (MILLIPORE), ya que deben estar exentos de trazas de metales pesados, tóxicos para los cultivos "in vitro", de cualquier estirpe celular.

Una vez disueltos los compuestos del medio, se procede a su esterilización por filtración, realizándose a través de filtros Sterivex - Gs (MILLIPORE) de 0,22 micrómetros de poro y bajo presión positiva de 1,2 Kg/cm^2, presión suministrada por una bomba peristáltica (MILLIPORE, modelo 7016. 2L).

El trasvase del medio de cultivo se lleva a cabo en el interior de una cámara de flujo laminar vertical, directamente al interior de matraces con tapón de rosca, esterilizados previamente en autoclave a 120º C durante 30 minutos. Los frascos conteniendo el medio estéril se almacena a 4ºC hasta el momento de su empleo.

Se siembran muestras de los medios en placas de agar-sangre, incubándose a 37ºC durante 72 horas, para comprobar su esterilidad.

Los aparatos de filtración, asi como los frascos, pipetas y en general todo el material empleado para los cultivos, se lavan con detergente Liquinox (ALCONOX INC. NY USA) especial para cultivos de tejidos, se enjuagan con agua destilada y se esterilizan en autoclave a 120ºC durante 30 min.

Todas las manipulaciones expuestas en el apartado de Material y Métodos, en lo que se refiere a experiencias y ensayos, se realizan con las más estrictas condiciones de esterilidad, ya que cualquier contaminación destruiría los cultivos.

II-11.- ANALISIS ESTADISTICO.

Para el estudio estadístico se han analizado las siguientes variables:

1.- Línea celular
2.- Dosis
3.- Tiempo

4.- Variables de crecimiento:

-Absorbancia

-Número de células

5.- Variables inmunoquímicas:

-Expresión de GP-170

-Expresión de citoqueratina

6.- Variables de análisis de imagen:

a) Variables morfométricas

-Area celular: Es el área total del objeto encerrado por una curva plana a través de los puntos de contorno.

-Perímetro: Es calculado como sigue,

$P = 0{,}98N_e + 1{,}406N_0 + 0{,}091N_c$, donde N_e=número de códigos pares Freeman, N_0=número de códigos impares Freeman y N_c= número de ángulos.

-Diámetro: Es el diámetro de un círculo con el mismo área que el objeto trazado.

-Factor de esfericidad (SP): $SP = P/\sqrt{n}Area$.

-Factor de regularidad (RE): RE = Coef.Variabilidad (Desv. estándar/media) del radio real

-Factor de elongación (Ef): $Ef = Area/longitud^2$

-Factor de asimetría (Af): Af = log [R grande / r pequeño]

b) Variables granulométricas

-Número de gránulos por célula

-Número de gránulos por área

-Area granular

-Area total de los gránulos

-Area media granular

En relación al software específico para medir la granularidad gruesa y fina, el software Texcan no facilita el método matemático utilizado para su cálculo

El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante los programas SIGMA y SPSS PC+, realizándose los siguientes test:

-Test de distribución normal de Kolmogorov-Smirnov para distintas variable.

-Comparación múltiple de medias (t de Student).

-Análisis de la varianza para 1 factor (ANOVA 1)(Test de Scheffé).

-Coeficiente de correlación simple (r de Pearson), considerando exclusivamente las relaciones con $r>0{,}6$ y $p<0{,}05$.

4.- Variables de crecimiento:

-Absorbancia

-Número de células

5.- Variables inmunoquímicas:

-Expresión de GP-170

-Expresión de citoqueratina

6.- Variables de análisis de imagen:

a) Variables morfométricas

-Area celular: Es el área total del objeto encerrado por una curva plana a través de los puntos de contorno.

-Perímetro: Es calculado como sigue,

$P= 0,98N_e+1,406N_0+0,091N_c$, donde N_e=número de códigos pares Freeman, N_0=número de códigos impares Freeman y N_c= número de ángulos.

-Diámetro: Es el diámetro de un circulo con el mismo área que el objeto trazado.

-Factor de esfericidad (SP): $SP = P/\sqrt{\pi Area}$.

-Factor de regularidad (RE): RE = Coef.Variabilidad (Desv. estándar/media) del radio real

-Factor de elongación (Ef): $Ef = Area/longitud^2$

-Factor de asimetría (Af): Af = log [R grande / r pequeño]

b) Variables granulométricas

-Número de gránulos por célula

-Número de gránulos por área

-Area granular

-Area total de los gránulos

-Area media granular

En relación al software específico para medir la granularidad gruesa y fina, el software Texcan no facilita el método matemático utilizado para su cálculo

El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante los programas SIGMA y SPSS PC+, realizándose los siguientes test:

-Test de distribución normal de Kolmogorov-Smirnov para cada variable en los distintos grupos diagnósticos.

-Análisis de la varianza para 1 factor (ANOVA 1).

-Coeficiente de correlación de Pearson y regresión simple y múltiple, considerando exclusivamente las relaciones con $r>0,6$ y $p<0,05$.

RESULTADOS

III.- RESULTADOS.

III-1.- CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES HELA, MCF-7, SK MEL-5 Y B-16.

El cuadro 1 reproduce la duración de las diferentes fases del ciclo celular para las líneas estudiadas. El tiempo de duplicación obtenido de la fase logarítmica fué para las líneas celulares de carcinoma, 46 horas en la línea **HeLa** y 49 horas en la línea **MCF-7**, y para las líneas de melanoma, 96 horas en la línea **SK Mel-5** y 31 horas en la línea **B-16.**

III-1.1.- INFLUENCIA DE LA LINEA CELULAR.

La cinética de crecimiento de las líneas celulares **HeLa, MCF-7, SK Mel-5 y B-16** presenta diferencias, utilizando las mismas condiciones de cultivo para todas ellas.

La línea celular de melanoma murino **B-16** demuestra mayor capacidad proliferativa según se deduce del estudio realizado sobre su curva de crecimiento (Gráfica 1), con una duración de la fase "lag" de 16 horas, de la fase "log" de 200 horas y comienzo de la fase de meseta a los 9 días (Tabla 1). El número de duplicaciones que experimentan estas células a los 7 días, tiempo en el que se han realizado la mayor parte de los ensayos, es de 5,5.

El estudio estadístico realizado mediante la t de Student demuestra que existen diferencias significativas en los valores medios de absorbancias para las líneas **B-16** y **HeLa** (1,71 y 0,85 $p<0,01$), **B-16** y **MCF-7** (1,71 y 0,66 $p<0,01$) y **B-16** y **SK Mel-5** (1,71 y 0,60 $p<0,01$) .

La línea **HeLa** ocupa el segundo lugar en cuanto a capacidad proliferativa respecto a las líneas ensayadas y en nuestras condiciones de trabajo. Su curva de crecimiento (Gráfica 2) presenta una duración de la fase "lag" de 24 horas, de la fase "log" de 240 horas y comienzo de la fase de meseta a los 11 días (Tabla 1). A lo largo de 7 días el número de duplicaciones realizadas por estas células es de 3,7. En esta línea celular se observan pequeñas diferencias en cuanto a su capacidad de proliferación con respecto a la línea celular **MCF-7**, siendo la comparación entre los valores medios de absorbancias casi significativa (0,85 y 0,66 $p<0,1$). Por el contrario, frente a la línea **SK Mel-5** las diferencias si alcanzan significación (0,85 y 0,59 $p<0,05$).

La curva de crecimiento de la línea celular **MCF-7** (Gráfica 3) presenta una duración de la fase "lag" de 24 horas, de la fase "log" de 240 horas y alcanza la fase de meseta a las 11 días

(Tabla 1). El número de duplicaciones que realiza esta línea al cabo de 7 días en nuestras condiciones de cultivo es de 3,5. No existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad proliferativa entre las líneas **MCF-7** y **SK Mel-5** (0,65 y 0,59) aunque como puede apreciarse en la observación de las curvas de crecimiento, la línea **SK Mel-5** posee menor actividad proliferativa que la línea **MCF-7** en nuestras condiciones de cultivo.

La curva de crecimiento de la línea celular **SK Mel-5** (Gráfica 4) presenta una duración de la fase "lag" de 33 horas, de la fase "log" de 396 horas, y alcanza la fase de meseta a los 18 días (Tabla 1). A los 7 días de cultivo el número de duplicaciones experimentado por esta línea es de 1,8.

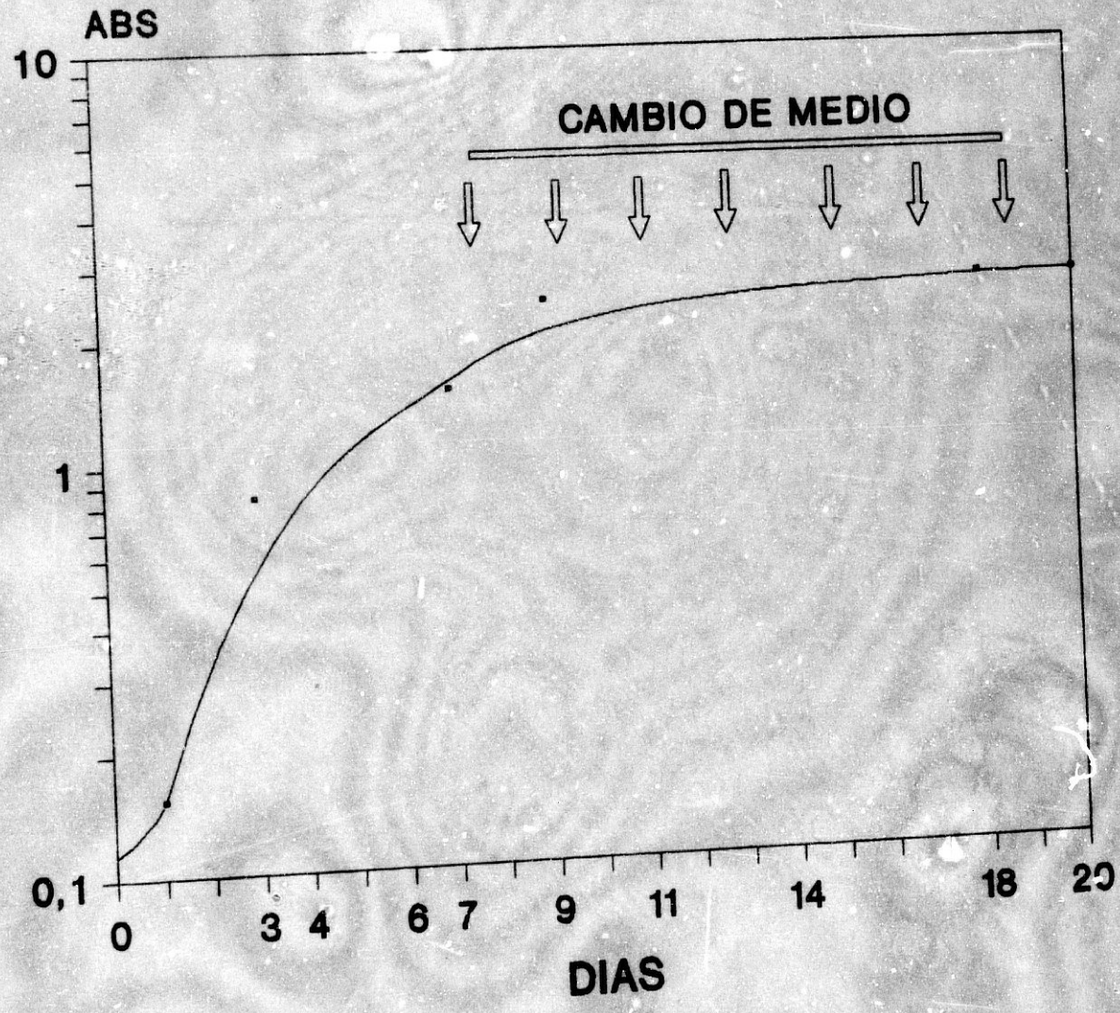
La comparación genérica entre los valores de absorbancias de las líneas celulares ensayadas evaluada por análisis de varianza, demuestra que existen diferencias significativas ($p<0,01$, ANOVA 1) a lo largo del tiempo en el cual se ha realizado la experiencia.

De igual forma, al extrapolar los valores de absorbancias a número de células y comparar individualmente las distintas líneas entre si mediante el test de Student existen diferencias estadísticamente significativas entre las líneas **HeLa** y **B-16** (87.917 y 137.357 $p<0,001$), **HeLa** y **SK Mel-5** (87.917 y 25.324 $p<0,001$), **MCF-7** y **SK Mel-5** (82.411 y 25324 $p<0,001$), **MCF-7** y **B-16** (82.411 y 137.357 $p<0,001$) y **SK Mel-5** y **B-16** (25.324 y 137.357 $p<0,001$) no encontrándose diferencias significativas entre las líneas **HeLa** y **MCF-7** (87.917 y 82.411).

Tabla 1. VALORES OBTENIDOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES EN CONDICIONES ESTANDAR DE CULTIVO.

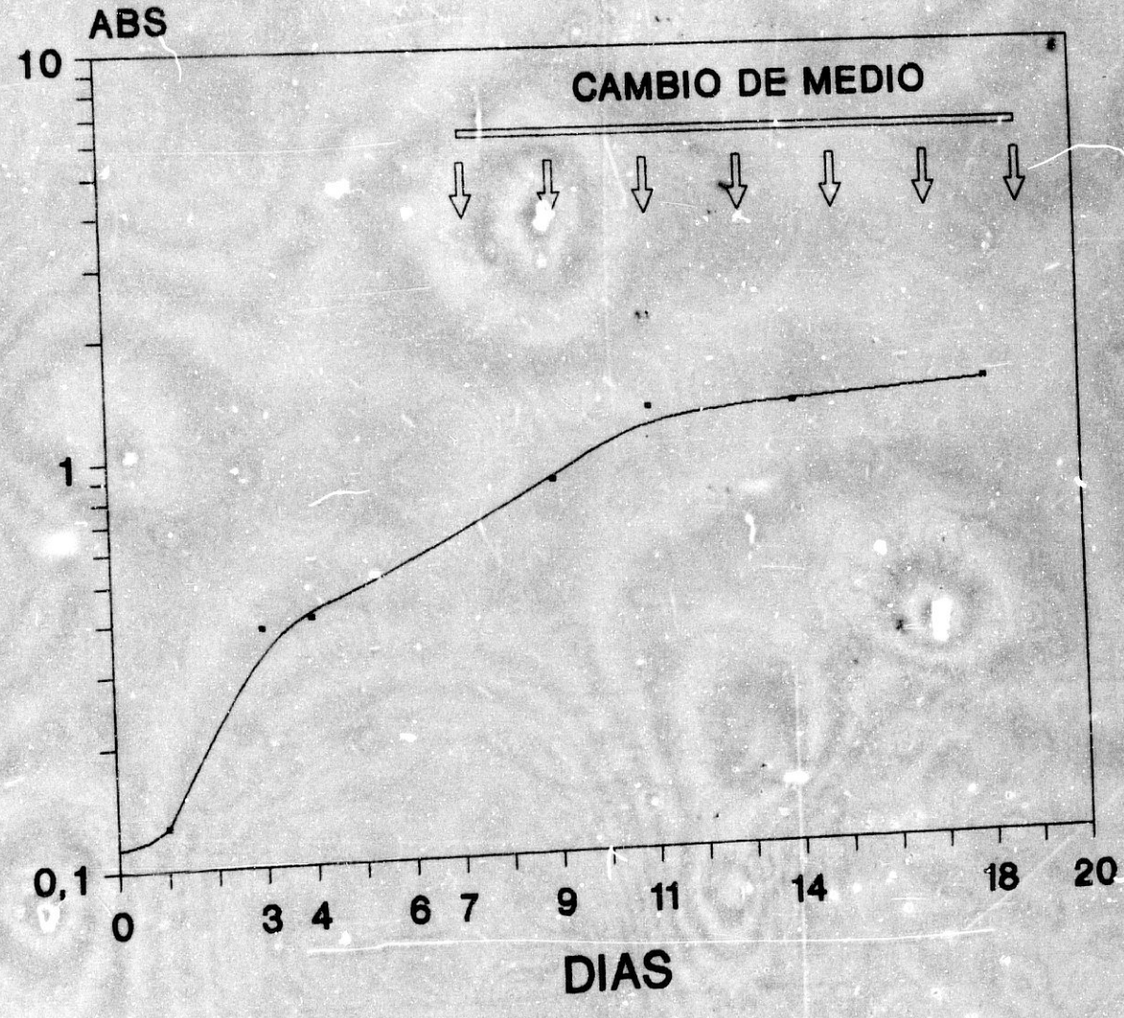
	FASES DEL CICLO CELULAR			
L I N E A S	Lag. (horas)	Log. (horas)	Meseta (días)	Td (horas)
HeLa	24	240	11	46
MCF-7	24	240	11	49
SK-Mel-5	33	396	18	96
B-16	16	200	9	31

CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16



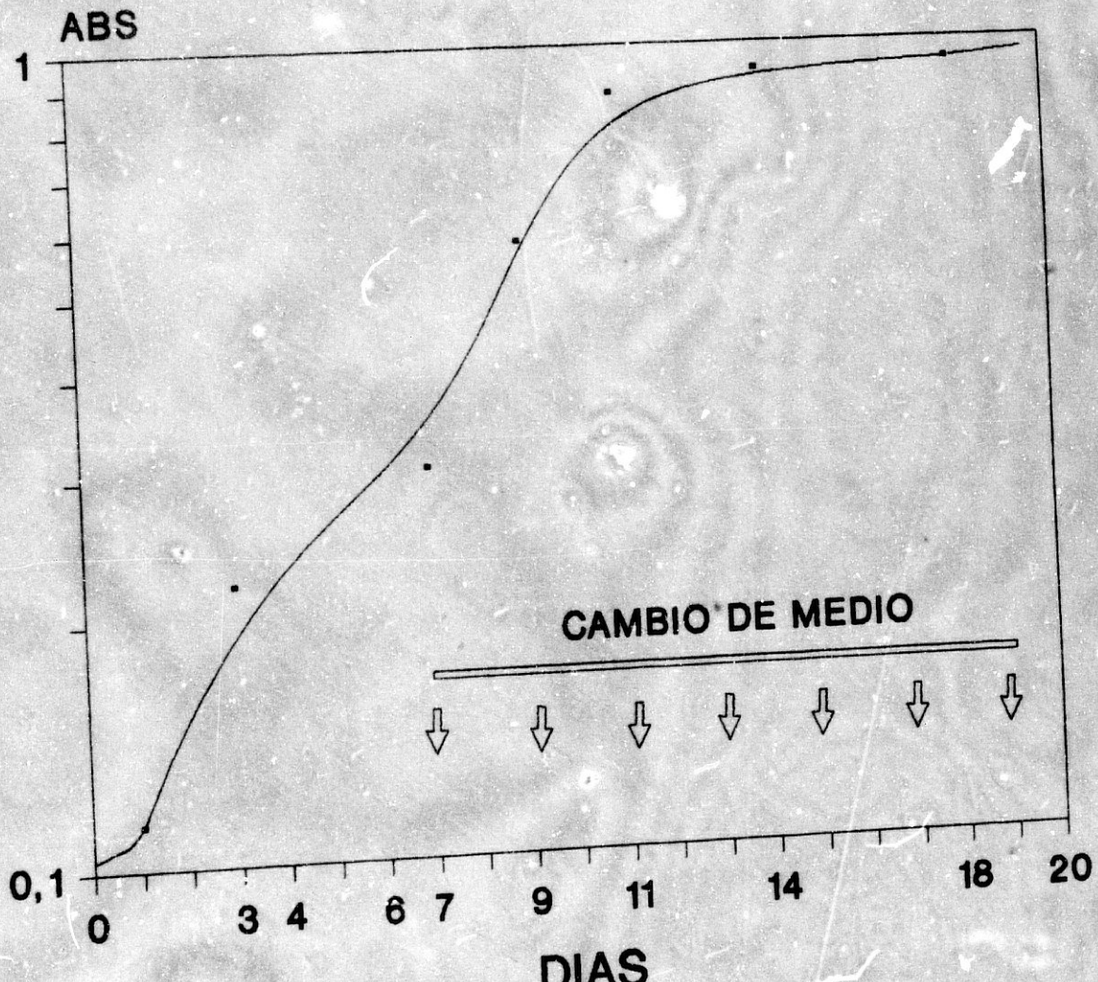
GRAFICA 1

CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA HeLa



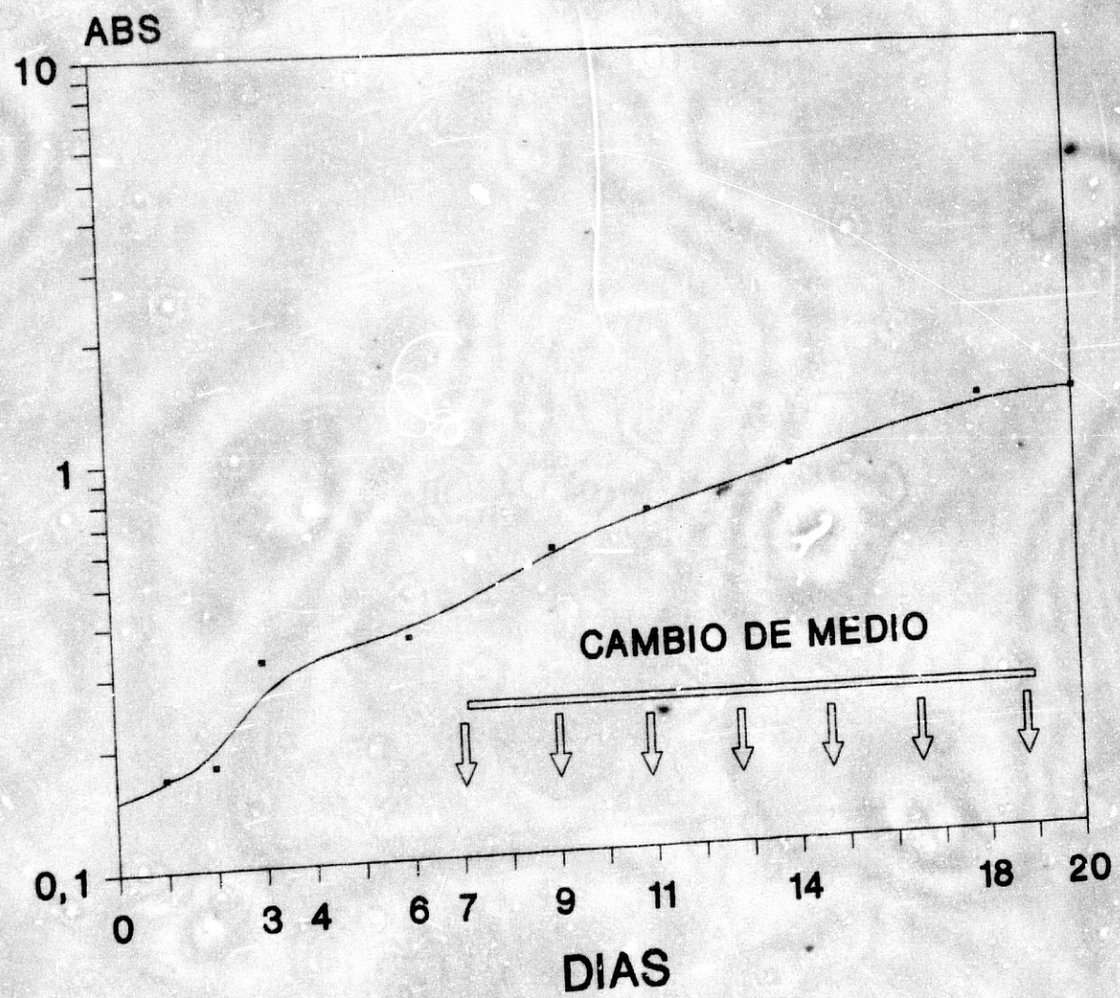
GRAFICA 2

CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LINEA DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7



GRAFICA 3

CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA SK Mel-5



GRAFICA 4

III-2.- ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA CsA SOBRE LAS LINEAS CELULARES HELA, MCF-7, SK MEL 5 Y B-16.

Para poder traducir los valores de absorbancias a número de células con el fin de estudiar la actividad antiproliferativa de la CsA en las líneas celulares ensayadas, se ha elaborado una curva patrón para cada una de ellas.

Los valores mayores de absorbancias, siempre referidos al mismo número de células, corresponden a la línea **SK Mel-5**, seguida de la **B-16**, **HeLa** y **MCF-7** a la que le corresponden los valores mas bajos como puede observarse en las tablas 2, 3, 4 y 5. La comparación entre los valores medios de absorbancias para un mismo número de células de cada una de las líneas ensayadas respecto a las demás mediante la t de Student, indica que solo existen diferencias estadísticamente significativas entre las líneas **MCF-7** y **SK Mel-5**, siendo mayor cuando el número de células es bajo (2.500 a 20.000 $p<0,01$) y perdiendo significación estadística para mayor número de células (40.000 a 80.000 $p<0,1$).

Las curvas patrón elaboradas para cada una de las líneas celulares se representan en las gráficas 5, 6, 7 y 8 y los datos correspondientes a cada una de ellas aparecen en las tablas 2, 3, 4 y 5.

Para estudiar la actividad antiproliferativa de las líneas celulares ensayadas se ha utilizado CsA sustancia base y ciclosporina (DCI) (Sandimmun^{R}, SANDOZ), como se indica en el apartado II-2. de Material y Métodos, obteniéndose resultados similares con ambos preparados, sin que existan diferencias estadísticamente significativas en los efectos obtenidos para todas las concentraciones empleadas.

La CsA ha demostrado un efecto antiproliferativo frente a las líneas celulares ensayadas de carcinoma y melanoma, si bien solo se ha observado claramente a dosis que superan los niveles terapéuticos (5 µg/ml).

III-2.1.- CURVAS DOSIS RESPUESTA DE LAS LINEAS CELULARES ENSAYADAS.

La representación de las curvas dosis respuesta de las líneas celulares **HeLa**, **MCF-7**, **SK Mel-5** y **B-16** corresponden respectivamente a las gráficas 9, 10, 11 y 12.

El porcentaje de supervivencia (% S) se deduce de la relación establecida con respecto a los valores de los pocillos control, atendiendo a la fórmula:

$$\% S = 100 - \frac{C - P}{C} 100$$

Donde C = Nº de células obtenido de los cultivos control.
P = Nº de células obtenido de los cultivos tratados.

Línea celular **HeLa**.-

Esta línea de carcinoma cuando se analiza comparativamente en el global de las líneas estudiadas muestra un crecimiento intermedio con tendencia a alto en nuestras condiciones de cultivo.

Cuando es incubada con CsA a las concentraciones de 5, 1, 0,5, 0,1, 0,01 µg/ml solo se observan diferencias estadísticamente significativas ($p<0,01$) a la concentración de 5 µg/ml respecto al control tanto si comparamos valores de absorbancias como número de células (tablas 6 y 7).

Los % de supervivencia son: 38,3% a 5 µg/ml, 99% a 1µg/ml, 97,8% a 0,5 µg/ml, 111,36% a 0,1 µg/ml y 99,1% a 0,01 µg/ml (Gráfica 9).

Su IC50 es 4,03 µg/ml.

Si se analiza su poder reductor del MTT en el conjunto de las líneas ensayadas, puede considerarse intermedio con tendencia a bajo.

Línea celular **MCF-7**.-

La línea celular MCF-7 posee como característica en cultivo crecer en monocapa formando colonias de morfología poligonal, con una actividad proliferativa intermedia con tendencia a baja, con respecto al total de las líneas utilizadas en este trabajo.

El estudio estadístico mediante la t de Student de los valores de absorbancias, así como del número de células respecto a las dosis ensayadas, nos indica que existen diferencias significativas ($p<0,01$) tanto a concentración de 5µg/ml como de 0,5µg/ml de CsA respecto al control (tablas 8 y 9).

Los porcentajes de supervivencia son: 41,3% a concentración de 5 µg/ml, de 89,8% a 1µg/ml, de 79,7% a 0,5 µg/ml, 101% a 0,1 µg/ml y 93,9% a 0,01 µg/ml (Gráfica 10).

La IC50 es de 4,24 µg/ml.

En el global de las líneas analizadas, la línea **MCF-7** es la que presenta menores valores de absorbancia para un mismo número de células, es decir, es la línea que reduce menos la sal de tetrazolio.

Línea celular **SK Mel-5**.-

En nuestras condiciones de experimentación, la línea **SK Mel-5** es la que presenta menor proliferación, siendo esta característica apreciable por la simple observación microscópica de los pocillos control.

Incubada con CsA a las concentraciones establecidas, y analizados los datos de absorbancias y número de células respecto a las dosis, existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,01$) a la concentración de 5µg/ml respecto al control (tablas 10 y 11) siendo el % de supervivencia a esta concentración del 22%, este valor es el mas bajo de los obtenidos en las líneas tratadas. A otras concentraciones los porcentajes de supervivencia son: 102% a 1µg/ml, 83% a 0,5 µg/ml, 105% a 0,1 µg/ml y 101% a 0,01 µg/ml (Gráfica 11).

La IC50 es de 3,21 µg/ml.

Esta línea melánica es la que presenta mayor reducción del MTT, en el conjunto de las líneas estudiadas.

Línea celular **B-16**.-

En contraste con la otra línea de melanoma ensayada, la línea celular **B-16** es, con diferencia, la que posee mayor capacidad proliferativa y en la que el efecto antiproliferativo que se observa, cuando es incubada con CsA a concentración de 5 µg/ml, es menos acusado. La comparación estadística entre los valores medios de absorbancias y número de células a las dosis ensayadas, indica diferencias significativas ($p<0,05$) a concentración de 5µg/ml de CsA con relación al control (tablas 12 y 13).

Los porcentajes de supervivencia de esta línea celular a las dosis ensayadas son: 78% a 5 µg/ml, 102% a 1µg/ml, 82,9% a 0,5 µg/ml, 105,1% a 0,1 µg/ml y 101,2% a 0,01 µg/ml (Gráfica 12).

La IC50 es de 7,35 µg/ml.

Esta línea celular presenta menor poder reductor del MTT que la línea **SK Mel-5**, aunque mayor que el de las líneas de carcinoma.

El análisis global de los resultados de las curvas dosis-respuesta demuestra la existencia de significación estadística entre el comportamiento normal de las líneas y las células sometidas a la acción de la droga ($p<0,01$, ANOVA 1).

En resumen, y respecto a la dosis IC50, el valor de este parámetro en nuestras líneas de ensayo por orden creciente es el siguiente: **SK Mel-5** (IC50=3,21 µg/ml) < **HeLa** (IC50=4,03 µg/ml) < **MCF-7** (IC50=4,24 µg/ml) < **B-16** (IC50=7,35 µg/ml).

Los datos se expresan en base a los parámetros estadísticos de tendencia central y de dispersión: media, desviación estándar (DS), valores máximos y valores mínimos así como análisis de la varianza para uno de los factores correspondientes a los valores de absorbancia en las líneas celulares adicionadas con las distintas concentraciones ensayadas.

Tabla 2. CURVA PATRON DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA DE CUELLO UTERINO HeLa.

Nº células	ABS ± DS
80.000	0,78±0,19
40.000	0,44±0,07
20.000	0,29±0,08
10.000	0,21±0,03
5.000	0,15±0,03
2.500	0,11±0,02

Los resultados son la media de 2 experiencias con 3 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica

Tabla 3. CURVA PATRON DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7

Nº células	ABS ± DS
80.000	0,63±0,15
40.000	0,38±0,01
20.000	0,24±0,05
10.000	0,17±0,03
5.000	,13±0,02
2.500	0,10±0,02

Los resultados son la media de 2 experiencias con 3 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Tabla 4. CURVA PATRON DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK MEL-5.

Nº células	ABS ± DS
80.000	1,57±0,60
40.000	0,86±0,38
20.000	0,56±0,16
10.000	0,34±0,13
5.000	0,21±0,06
2.500	0,14±0,05

Los resultados son la media de 2 experiencias con 3 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Tabla 5. CURVA PATRON DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16.

Nº células	ABS ± DS
80.000	0,98±0,39
40.000	0,76±0,11
20.000	0,45±0,17
10.000	0,29±0,10
5.000	0,19±0,06
2.500	0,13±0,03

Los resultados son la media de 2 experiencias con 3 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Tabla 6. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR HeLa REFERIDO A VALORES DE ABSORBANCIAS.

DOSIS µg/ml	ABS	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	0,41±0,09	0,21	0,62	-
5	0,22±0,07	0,08	0,36	p<0,01
1	0,41±0,08	0,26	0,64	NS
0,5	0,40±0,08	0,26	0,58	NS
0,1	0,44±0,11	0,21	0,69	NS
0,01	0,41±0,13	0,18	0,69	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

ABS: Valores de absorbancia.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 7. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR HELA REFERIDO A NUMERO DE CELULAS.

DOSIS µg/ml	Nº CEL.	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	35.527±10.850	12.439	60.585	-
5	13.604± 8.238	-2.864	29.626	p<0,01
1	35.183± 9.616	18.089	62.351	NS
0,5	34.733± 9.968	17.854	55.641	NS
0,1	39.563±12.460	12.557	68.472	NS
0,01	35.208±15.647	8.437	68.943	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Nº CEL: Número de células.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 8. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR MCF-7 REFERIDO A VALORES DE ABSORBANCIAS.

DOSIS µg/ml	ABS	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	0,41±0,04	0,31	0,50	-
5	0,23±0,11	0,09	0,43	p<0,01
1	0,37±0,06	0,26	0,50	NS
0,5	0,34±0,06	0,21	0,44	p<0,01
0,1	0,41±0,05	0,33	0,50	NS
0,01	0,39±0,05	0,30	0,50	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

ABS: Valores de absorbancia.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 9. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR MCF-7 REFERIDO A NUMERO DE CELULAS.

DOSIS µg/ml	Nº CEL.	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG
Control	45.174± 6.570	31.105	59.368	-
5	18.642±19.930	-1.301	48.122	p<0,01
1	40.560± 8.252	23.854	58.628	NS
0,5	35.980± 8.152	17.639	50.637	NS
0,1	45.660± 7.566	34.508	59.664	NS
0,01	42.409± 6.684	29.625	59.812	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Nº CEL: Número de células.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 10. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR SK MEL-5 REFERIDO A VALORES DE ABSORBANCIAS.

DOSIS µg/ml	ABS	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	0,42±0,13	0,23	0,69	-
5	0,19±0,05	0,10	0,29	p<0,01
1	0,42±0,14	0,24	0,71	NS
0,5	0,37±0,11	0,21	0,62	NS
0,1	0,43±0,14	0,19	0,71	NS
0,01	0,42±0,14	0,20	0,70	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

ABS: Valores de absorbancia.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 11. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR SK Mel-5 REFERIDO A NUMERO DE CELULAS.

DOSIS µg/ml	Nº CEL.	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	15.629± 6.924	5.270	30.847	-
5	3.447± 2.739	-1.881	8.460	p<0,01
1	16.060± 7.648	5.710	31.982	NS
0,5	12.954± 5.854	4.169	26.942	NS
0,1	16.426± 7.626	3.399	31.617	NS
0,01	15.810± 7.947	3.894	31.177	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Nº CEL: Número de células.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 12. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR B-16 REFERIDO A VALORES DE ABSORBANCIAS.

DOSIS µg/ml	ABS	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	1,37±0,26	0,88	1,90	-
5	1,08±0,30	0,50	1,71	p<0,05
1	1,53±0,33	0,84	2,16	NS
0,5	1,32±0,38	0,65	2,10	NS
0,1	1,49±0,37	0,87	2,23	NS
0,01	1,31±0,31	0,83	2,07	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

ABS: Valores de absorbancia.

NIV. SIG. : Nivel de significación

Tabla 13. EFECTO DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR B-16 REFERIDO A NUMERO DE CELULAS.

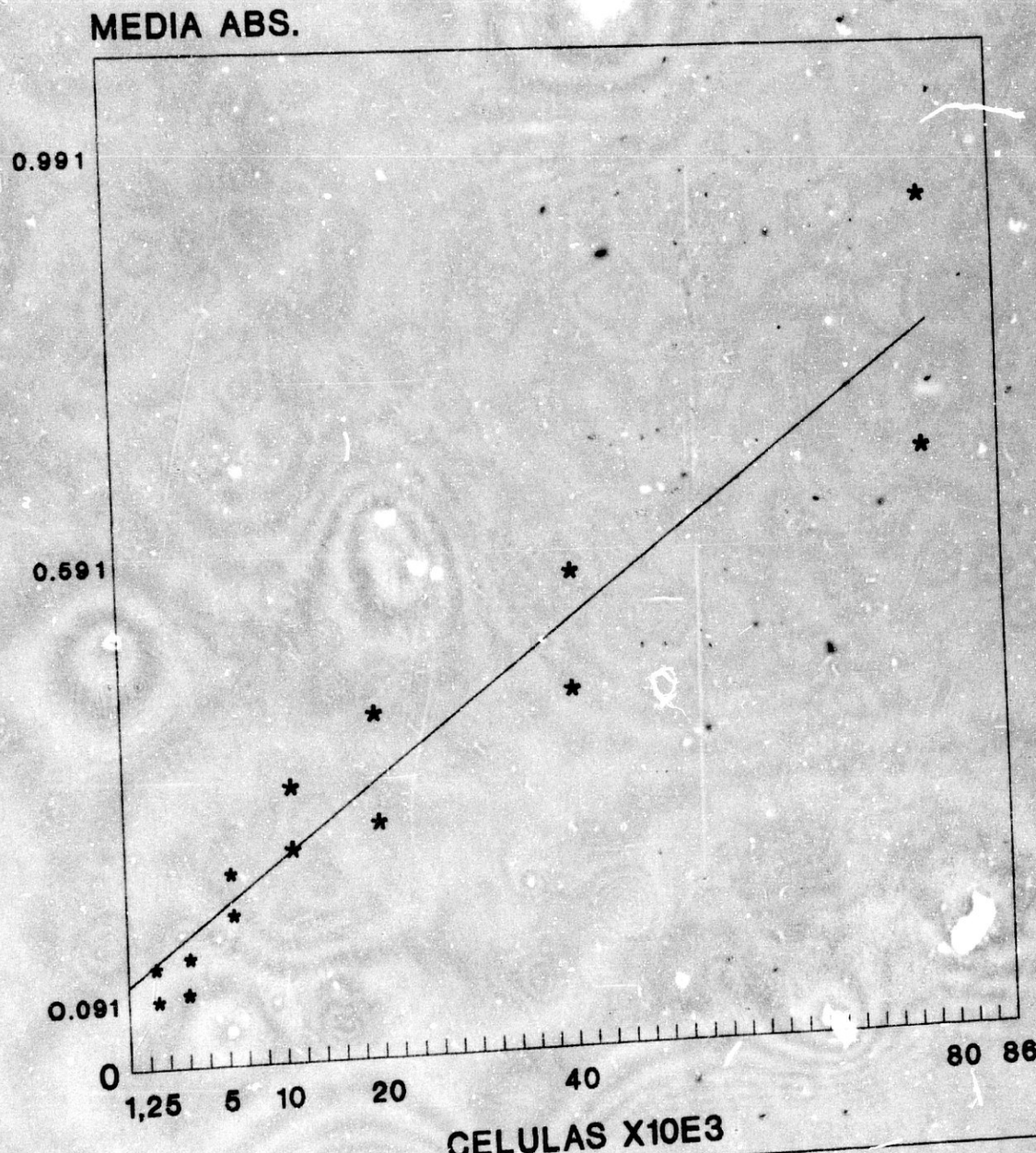
DOSIS µg/ml	Nº CEL.	MINIMO	MAXIMO	NIV. SIG.
Control	107.031±23.272	63.744	54.258	-
5	81.787±26.720	29.879	37.503	p<0,01
1	121.657±29.832	59.666	77.485	NS
0,5	102.712±33.699	43.442	71.988	NS
0,1	118.583±32.569	62.769	83.425	NS
0,01	101.867±27.871	59.311	69.063	NS

Los resultados son la media de 4 experiencias con 10 réplicas en cada una de ellas ± Desviación típica.

Nº CEL: Número de células.

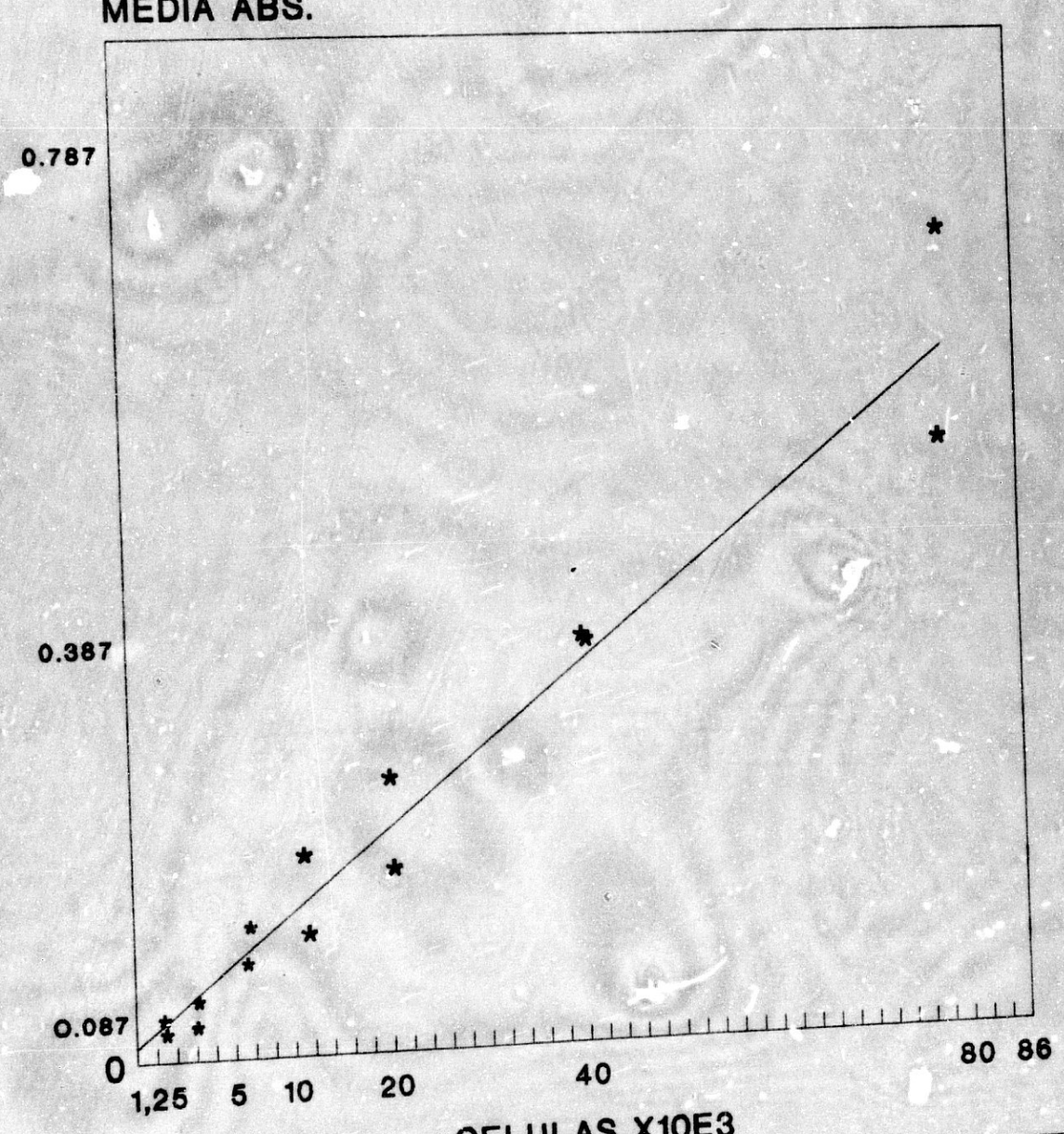
NIV. SIG. : Nivel de significación

RECTA DE REGRESION DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA HeLa



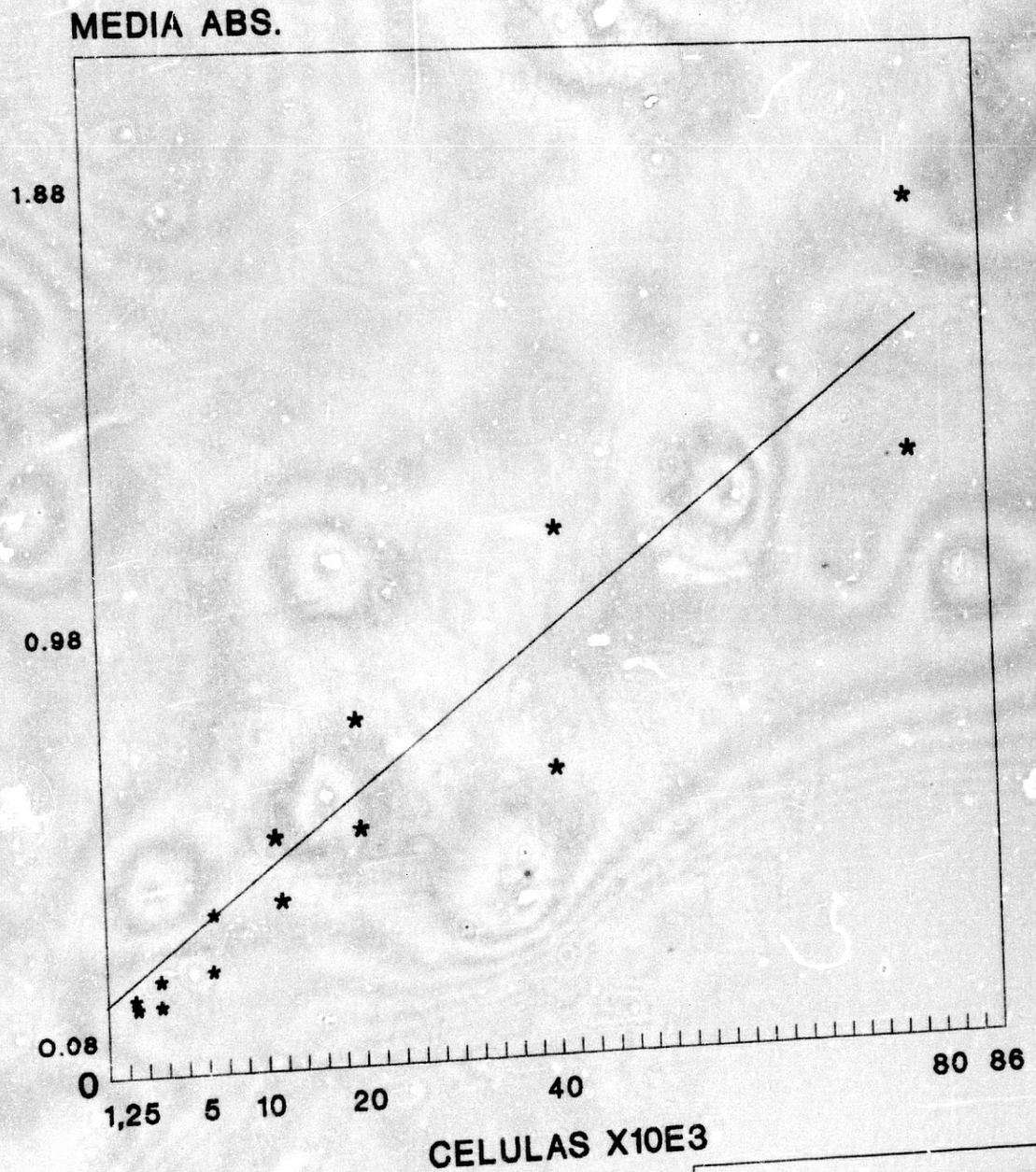
GRAFICA 5

RECTA DE REGRESION DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7



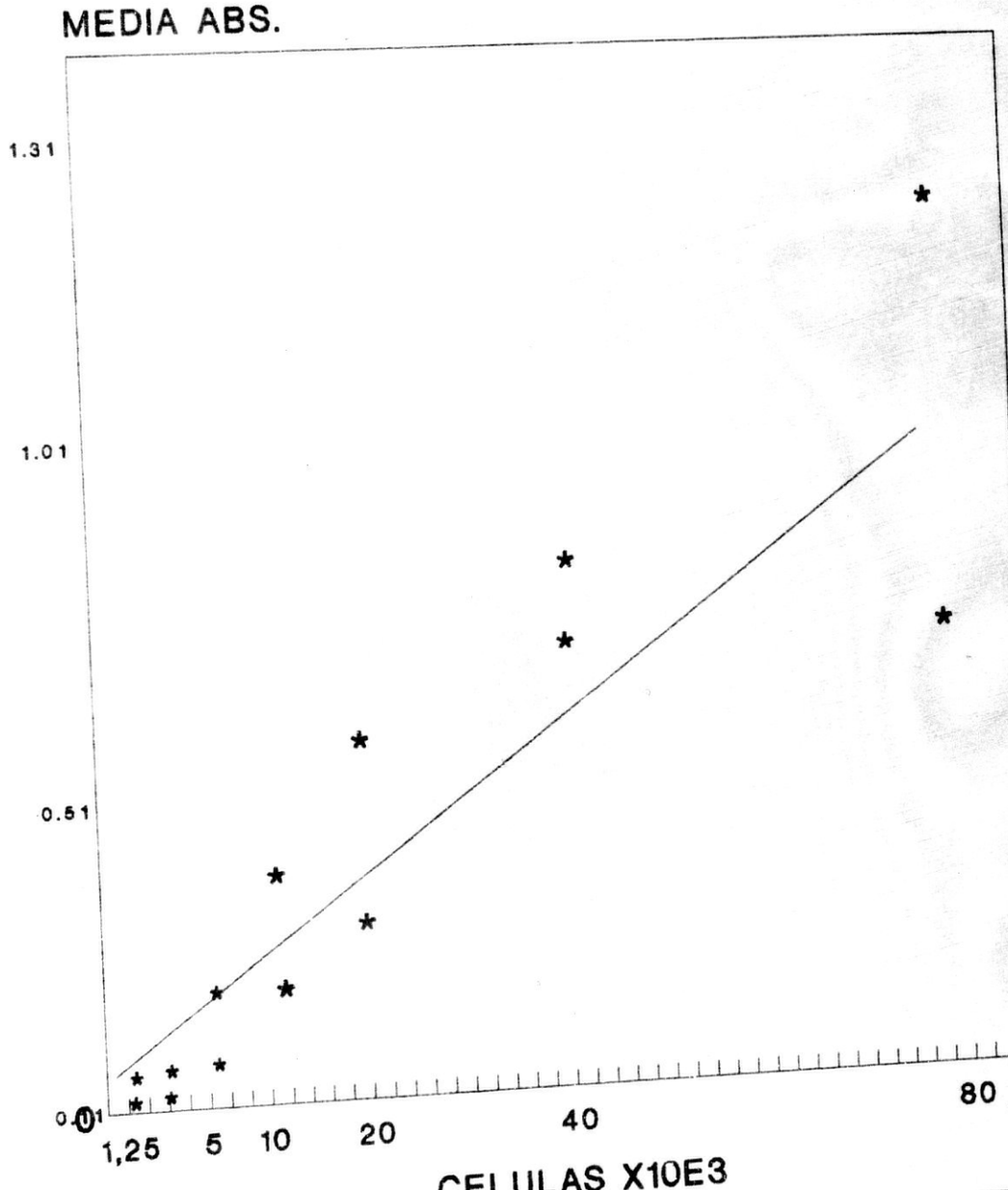
GRAFICA 6

RECTA DE REGRESION DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK Mel-5



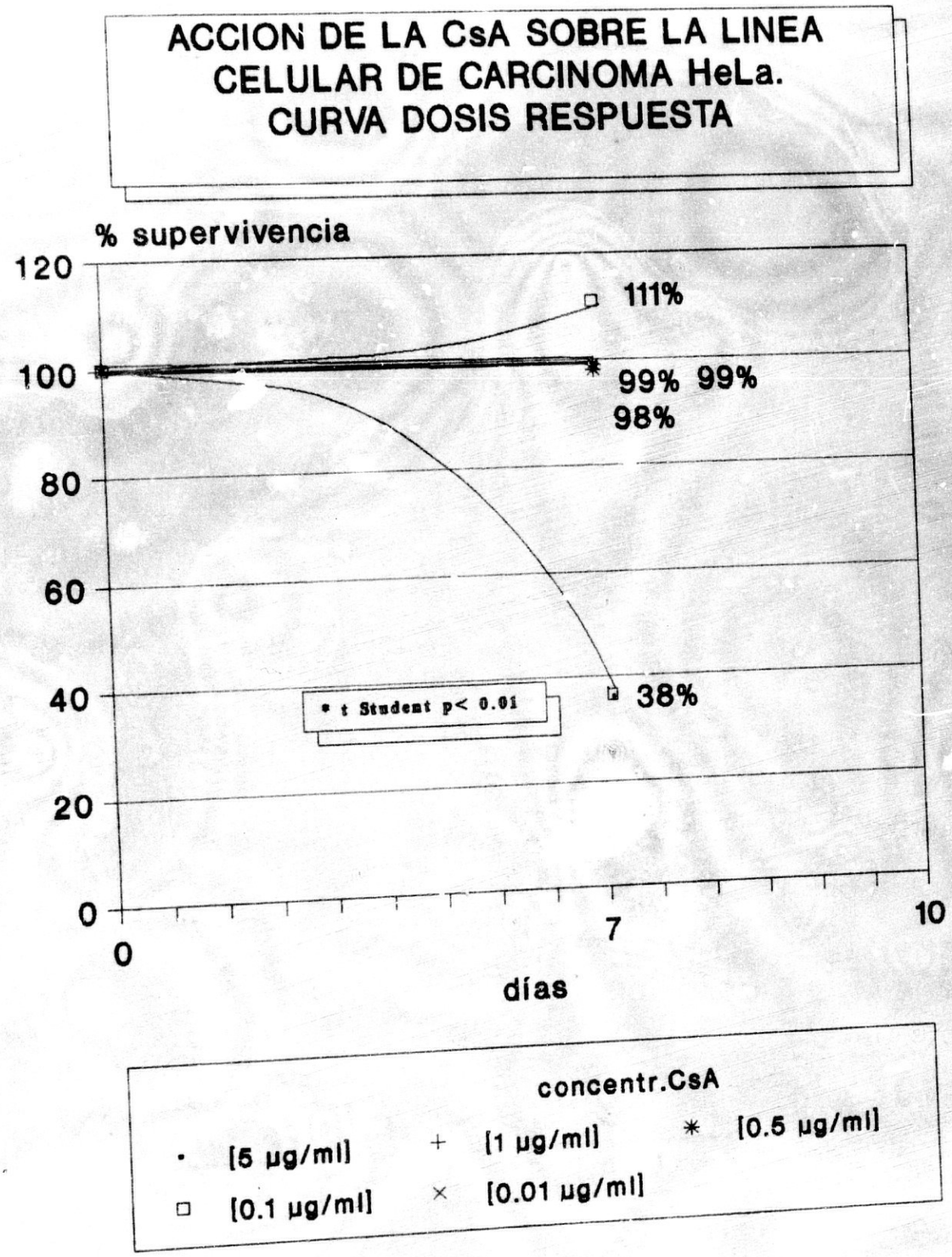
GRAFICA 7

RECTA DE REGRESION DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16

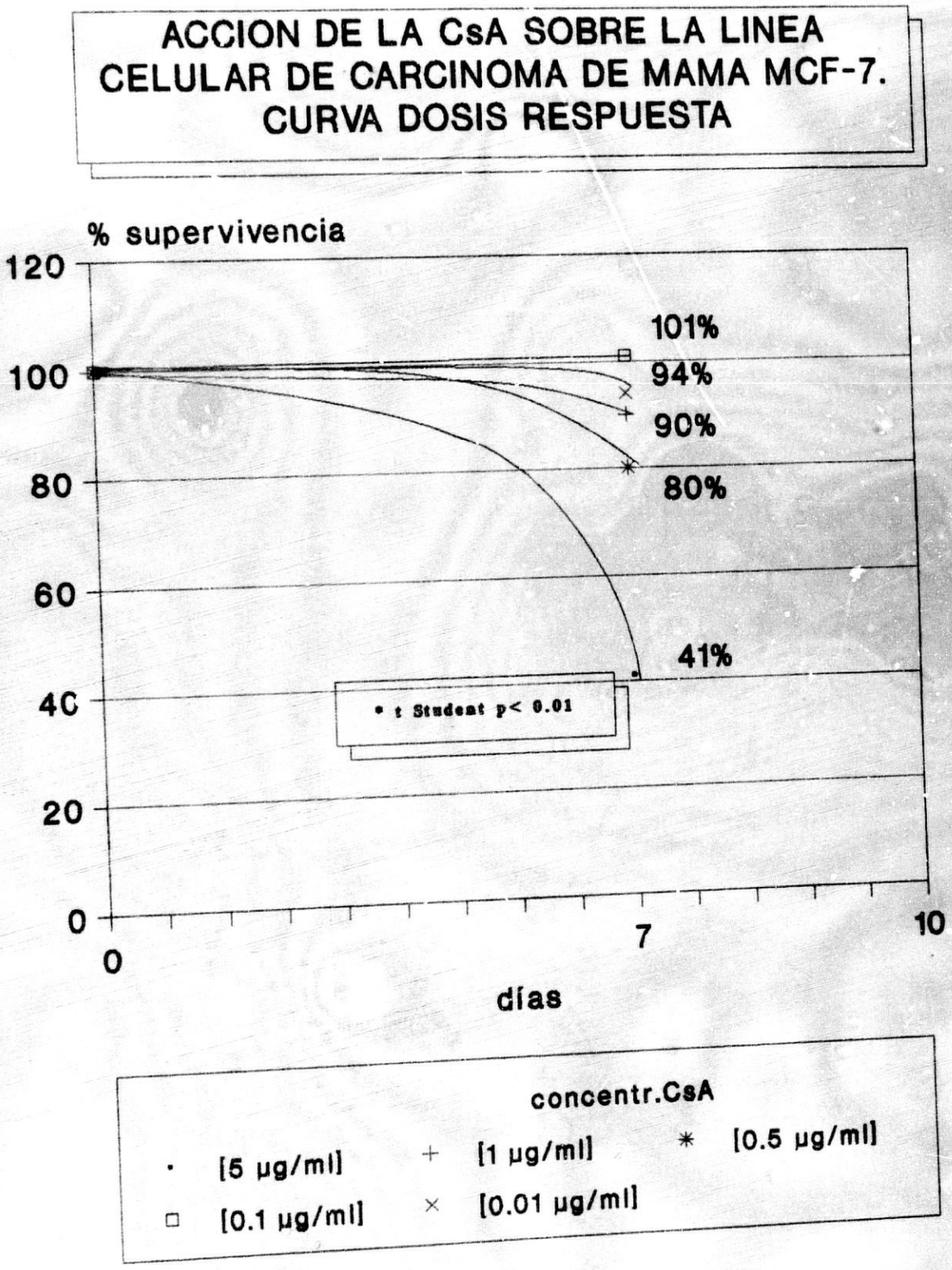


Y=0,16+1,13x10E-5X
r=0,9033

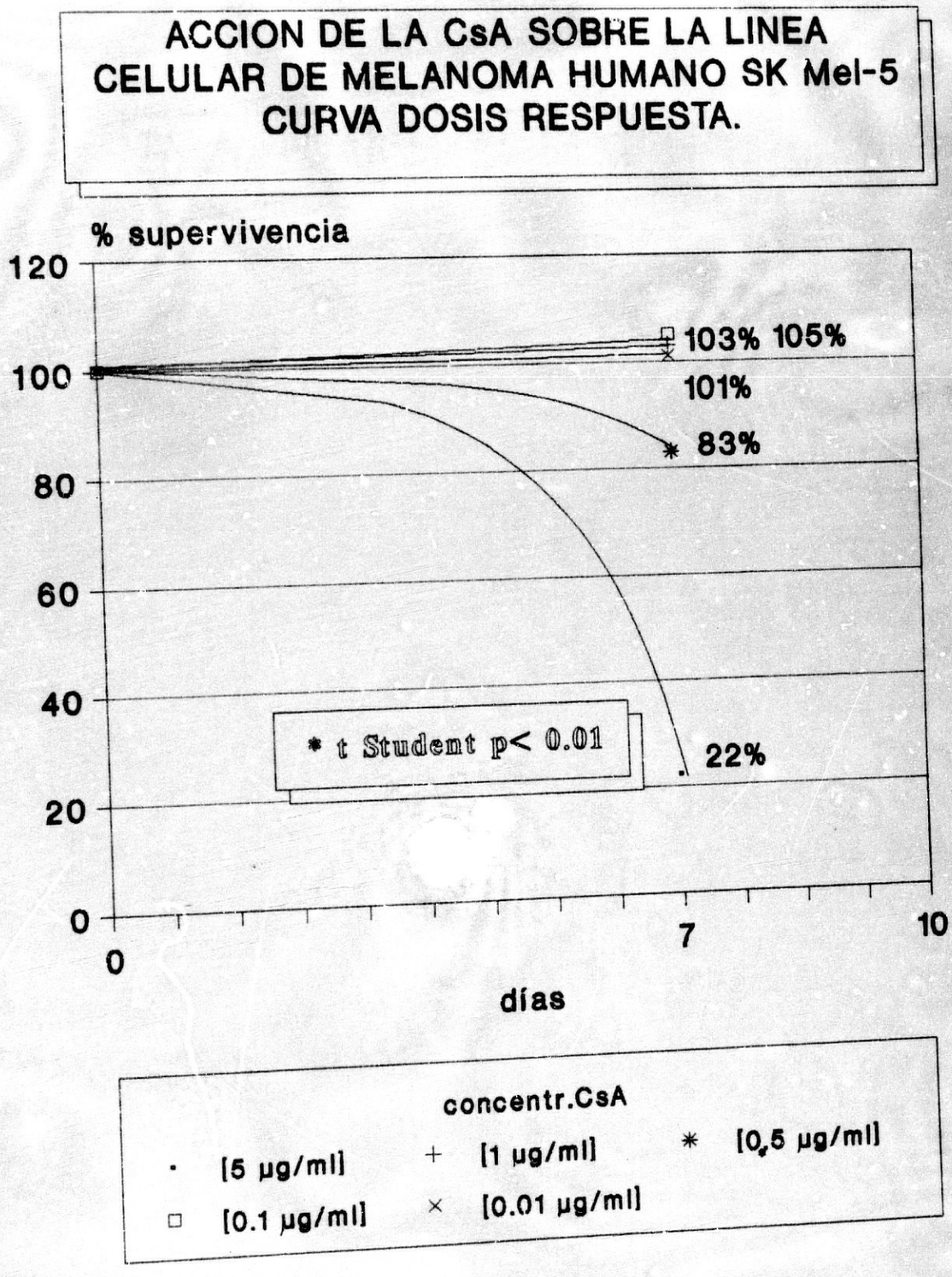
GRAFICA 8


ACCION DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA HeLa. CURVA DOSIS RESPUESTA
% supervivencia
120
100
80
60
40
20
0
0
7
10
días
111%
99%
99%
98%
38%
* t Student p< 0.01
concentr.CsA
[5 µg/ml]
[1 µg/ml]
[0.5 µg/ml]
[0.1 µg/ml]
[0.01 µg/ml]

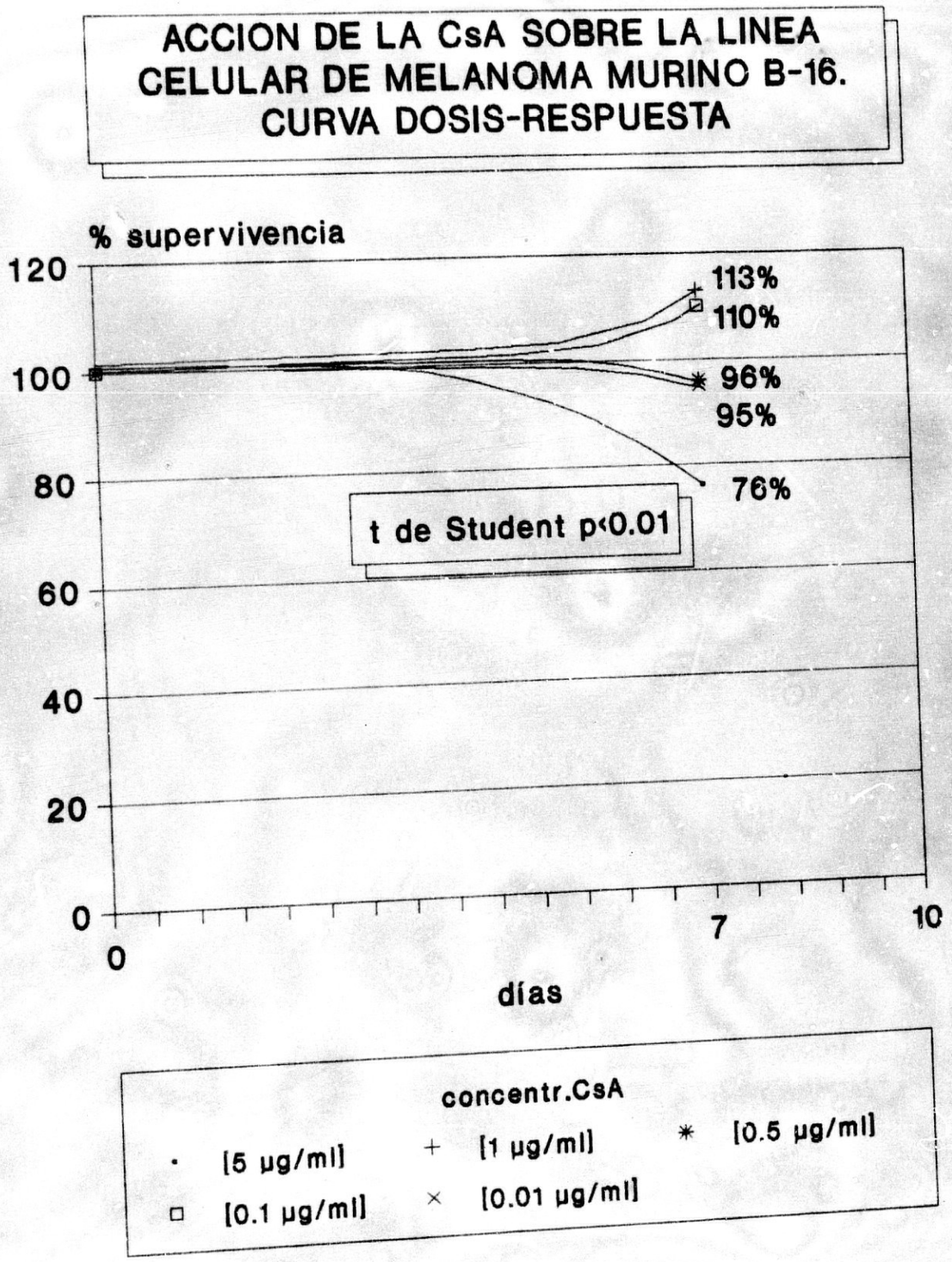
GRAFICA 9


ACCION DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7. CURVA DOSIS RESPUESTA
% supervivencia
120
100
80
60
40
20
0
0
7
10
días
101%
94%
90%
80%
41%
* t Student p< 0.01
concentr.CsA
· [5 µg/ml]
+ [1 µg/ml]
* [0.5 µg/ml]
□ [0.1 µg/ml]
× [0.01 µg/ml]

GRAFICA 10


ACCION DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK Mel-5 CURVA DOSIS RESPUESTA.
% supervivencia
120
100
80
60
40
20
0
0
7
10
días
103% 105%
101%
83%
22%
* t Student p< 0.01
concentr.CsA
· [5 µg/ml]
+ [1 µg/ml]
* [0,5 µg/ml]
□ [0.1 µg/ml]
× [0.01 µg/ml]

GRAFICA 11


ACCION DE LA CsA SOBRE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16. CURVA DOSIS-RESPUESTA
% supervivencia
120
100
80
60
40
20
0
0
7
10
días
113%
110%
96%
95%
76%
t de Student p<0.01
concentr.CsA
[5 µg/ml]
[1 µg/ml]
[0.5 µg/ml]
[0.1 µg/ml]
[0.01 µg/ml]

GRAFICA 12

III-3.- VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA DE GP-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.

III-3.1.- ANALISIS DESCRIPTIVO DE RESULTADOS.

La expresión de la glicoproteina de membrana P-170 se ha estudiado en las líneas celulares **HeLa, MCF-7, SK Mel-5** y **B-16** en controles celulares no tratados y células tratadas con CsA a concentraciones próximas a los niveles terapéuticos, 0,5 y 1 µg/ml y que como se ha visto anteriormente, no tienen efecto antiproliferativo notable sobre las líneas ensayadas.

Los resultados se obtuvieron tras 7 y 30 días de exposición a la droga.

El antígeno de membrana, GP-170, se ha testificado mediante los anticuerpos C-219 y JSB-1, con las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta para el AcMo C-219 y en el caso del AcMo JSB-1 mediante inmunofluorescencia indirecta. Los resultados a los que se hace alusión se refieren a los obtenidos con el AcMo JSB-1, ya que el AcMo de ratón C-219, tanto por la técnica de inmufluorescencia directa como con la indirecta, no ha permitido mostrar diferencias con la fluorescencia inespecífica presente en los controles negativos. No obstante, en las Figuras 3 a la 26, hemos representado en cada una de ellas los histogramas correspondientes a control sin Ac primario, citoqueratina y a los anticuerpos monoclonales C-219 y JSB-1 respectivamente, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos, para cada una de las líneas, de la expresión de GP-170 en células no tratadas y tratadas con 0.5 y 1 µg/ml de CsA, a 7 y 30 días de exposición a la droga.

Aunque como se especifica en el apartado II-6.2.2 de Material y Métodos, el número de células de partida en la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta fué siempre el mismo (10^6 células), debido a los sucesivos lavados realizados existen grandes pérdidas celulares , por lo que el número de células de las suspensiones celulares finales de las que el dosificador del citómetro de flujo toma las muestras, oscilaron entre 1.000-50.000, por ello, los valores de la expresión de GP-170 hacen referencia al porcentaje de células marcadas con fluoresceina y no a número absoluto de elementos inmunomarcados.

Respecto a la expresión de GP-170, se observan dos comportamientos distintos de las líneas celulares ensayadas cuando son mantenidas en cultivo durante 30 días en nuestras condiciones de trabajo. Las líneas **HeLa**, **MCF-7** y **SK Mel-5** experimentan una disminución de la expresión de la GP-170 a lo largo de este período, siendo mas acusada en la línea de carcinoma de cuello de útero, **HeLa** (Gráfica 13), seguida de la **MCF-7** (Gráfica 14) y **SK Mel-5**

(Gráfica 15), siendo esta última línea donde la expresión antigénica desciende menos a los 30 días de cultivo. La línea de melanoma murino **B-16** no presenta modificación de la expresión del antígeno de membrana tras permanecer durante 1 mes en cultivo (Gráfica 16).

El comportamiento de las líneas celulares testificadas respecto a la expresión de GP-170 fué diferente para cada una de ellas, en función del tiempo y las concentraciones ensayadas de CsA.

Cuando la línea celular **HeLa** es tratada con CsA a concentraciones de 0,5 y 1µg/ml, a los 7 días de exposición a la droga, la expresión de la GP-170 no se modula. Tras 30 días de tratamiento, las células **HeLa** expuestas a 0,5 µg/ml de CsA mantienen el valor de la expresión antigénica, mientras que en las células tratadas con 1 µg/ml, disminuye la expresión de GP-170, pero no de forma tan acusada como en los controles (Gráfica 13).

La determinación de citoqueratina en esta línea celular fué positiva tanto en los controles como en las células expuestas a la CsA, sin que se produjeran modificaciones de este parámetro ni en función de la concentración de CsA ni con el tiempo.

Los histogramas obtenidos del citómetro de flujo para la línea **HeLa** sin tratamiento y tratada a 0,5 y 1 µg/ml de CsA a 7 y 30 días de ensayo se representan en las figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En la línea celular **HeLa** no se modula la expresión del antígeno de membrana en las células tratadas con 0,5 µg/ml de CsA, mientras que se origina una pequeña modificación de este valor en las tratadas con 1 µg/ml de CsA (Tabla 14).

La comparación de las medias de esta expresión antigénica en función del tiempo en la línea celular **HeLa** presenta una disminución considerable de este valor a los 30 días con relación siempre a los 7 días de la experiencia (Tabla 15).

La otra línea de carcinoma, **MCF-7** (Gráfica 14), tras tratamiento con CsA sufre una modulación precoz a la baja que es ya ostensible a la semana de exposición a la droga. A los 30 días de tratamiento, la expresión del antígeno de membrana desciende levemente en las muestras tratadas, igualándose a los valores obtenidos para los controles, a diferencia de lo que ocurre para la línea **HeLa**.

En la línea celular **MCF-7** , al igual que en la línea **HeLa**, la determinación de citoqueratina fué positiva en todas las muestras celulares, manteniéndose el porcentaje de

positividad a diferentes tiempos y concentraciones ensayadas.

Los histogramas obtenidos del citómetro de flujo para la línea **MCF-7** sin tratamiento y tratadas a 0,5 y 1 µg/ml de CsA a 7 y 30 días de ensayo se representan en las figuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

En cuanto al estudio global de la expresión de la GP-170 en función de las concentraciones utilizadas en la línea celular de carcinoma de mama, **MCF-7**, se observa una modulación a la baja en los valores medios de la expresión del antígeno de membrana en las células tratadas con la droga, siendo mayor a 0,5 µg/ml que a 1 µg/ml de CsA (Tabla 16). La comparación de los valores medios de esta expresión antigénica en la línea celular **MCF-7** a los 7 y 30 días de ensayo muestra una disminución de la expresión a los 30 días de la experiencia (Tabla 17).

De forma general, en la línea melánica **SK Mel-5** (Gráfica 15), puede hablarse de un descenso con el tiempo de la expresión de GP-170 equiparable para los controles y las células tratadas, que es ostensible tan solo en la experiencia a 30 días. En relación con la dosis destaca la mayor intensidad del efecto a 0,5.

La línea **SK Mel-5** de melanoma humano no contiene filamento intermedio de citoqueratina reconocido por el cóctel panqueratínico de alto y bajo peso molecular.

Los histogramas obtenidos del citómetro de flujo para la línea **SK Mel-5** sin tratamiento y tratadas a 0,5 y 1 µg/ml de CsA a 7 y 30 días de ensayo se representan en las figuras 15, 16, 17, 18, 19 y 20.

En la línea de melanoma humano **SK Mel-5**, se observa un descenso del valor medio de la expresión de GP-170 en las células tratadas a concentración de 0,5 µg/ml, no modificándose este valor a 1 µg/ml de CsA (Tabla 18).

En cuanto al tiempo de exposición a la droga en relación con esta glicoproteína, se presenta en la línea **SK Mel-5** una disminución de la expresión de GP-170 a los 30 días de ensayo (Tabla 19).

En la línea celular **B-16** (Gráfica 16) a 7 días de ensayo, se observa un descenso de la expresión antigénica a 0,5 µg/ml de CsA, sin que se modifique este valor a 1 µg/ml de CsA. A los 30 días de exposición, la expresión de GP-170 aparece disminuida en las células expuestas

a la droga, igualándose para las dos concentraciones de CsA utilizadas, lo cual contrasta con el hecho de que en esta línea los controles no se modifican.

La línea celular B-16 al igual que ocurre con la otra línea melánica estudiada, SK Mel-5, no contiene filamento intermedio de citoqueratina frente al AcMo utilizado.

Los histogramas obtenidos del citómetro de flujo para la línea B-16 sin tratamiento y tratadas a 0,5 y 1 µg/ml de CsA a 7 y 30 días de ensayo se representan en las figuras 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

En la línea celular B-16 no se observan modificaciones de la expresión antigénica entre las células tratadas con 1 µg/ml de CsA y los controles, disminuyendo la expresión del antígeno de membrana en las células tratadas con 0,5 µg/ml de CsA (Tabla 20). A 30 días de la experiencia, se observa una disminución del valor medio de la expresión de GP-170 (Tabla 21).

El estudio del valor medio de la expresión de GP-170 a diferentes concentraciones de CsA añadidas a los cultivos (0,5 y 1 µg/ml), muestra una tendencia a la baja en los valores de dicha expresión, siendo esta disminuciópn mayor en las células tratadas con 0,5 µg/ml de CsA que a 1 µg/ml de CsA como puede observarse en la Tabla 22.

El análisis estadístico de los valores obtenidos de la expresión de GP-170 para el global de las líneas celulares ensayadas, demuestra que la expresión del antígeno de membrana se modifica con el tiempo de ensayo, como puede observarse en la Tabla 23, evidenciándose en general un descenso progresivo de los valores, aunque mediante el análisis de la varianza para un factor no sea estadísticamente significativo, debido al número reducido de determinaciones realizadas.

La comparación entre las medias de los valores de esta expresión antigénica en función del tiempo, indica que existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre los resultados obtenidos a 7 días respecto a los correspondientes a 30 días (Tabla 23).

Cuando comparamos los valores medios de los resultados obtenidos en la determinación de GP-170 a 7 y 30 días de tratamiento, teniendo en cuenta solo los valores de las células expuestas a la droga para cada una de las líneas celulares ensayadas, se observa una disminución del valor medio de la expresión de GP-170 en todas las líneas siendo mucho mas acusada en las líneas SK Mel-5 (disminuye el 88% respecto al valor de 7 días), B-16 (69%), HeLa (27,2%) y MCF-7 (25,5%).

Tabla 14. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR HELA EN FUNCION DE LAS CONCENTRACIONES UTILIZADAS.

CsA µg/ml	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
Control	38,13±29,76	7,0	66,3
1	33,60±19,37	21,0	55,9
0,5	41,63±10,06	30,3	49,5

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 15. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR HELA EN FUNCION DEL TIEMPO.

Tiempo (días)	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
7	44,50±15,92	23,9	66,3
30	24,37±19,27	7,0	45,1

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 16. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR MCF-7 EN FUNCION DE LAS CONCENTRACIONES UTILIZADAS.

CsA µg/ml	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
Control	33,40±37,00	9,2	76,0
1	20,10± 4,02	16,6	24,5
0,5	15,23±11,50	3,9	26,9

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 17. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR MCF-7 EN FUNCION DEL TIEMPO.

Tiempo (días)	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
7	26,62±25,76	3,9	76,0
30	15,50± 0,95	14,9	16,6

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 18. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 EN FUNCION DE LAS CONCENTRACIONES UTILIZADAS.

CsA µg/ml	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
Control	42,23±46,2	0,5	92,0
1	42,50±45,86	11,7	95,2
0,5	28,13±43,43	0,6	78,2

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 19. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 EN FUNCION DEL TIEMPO.

Tiempo (días)	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
7	47,20±45,70	0,5	95,2
30	18,47±16,90	0,6	34,2

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 20. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR B-16 EN FUNCION DE LAS CONCENTRACIONES UTILIZADAS.

CsA µg/ml	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
Control	48,53±27,02	17,7	68,1
1	48,30±31,30	12,6	71,0
0,5	32,43±13,24	19,8	46,2

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 21. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN LA LINEA CELULAR B-16 EN FUNCION DEL TIEMPO.

Tiempo (días)	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
7	47,88±20,23	17,7	71,0
30	33,50±30,18	12,6	60,1

Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 22. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN FUNCION DE LAS CONCENTRACIONES UTILIZADAS.

CsA µg/ml	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
Control	40,58±31,08	0,5	92
1	36,13±27,47	11,7	95,2
0,5	29,36±22,71	0,6	78

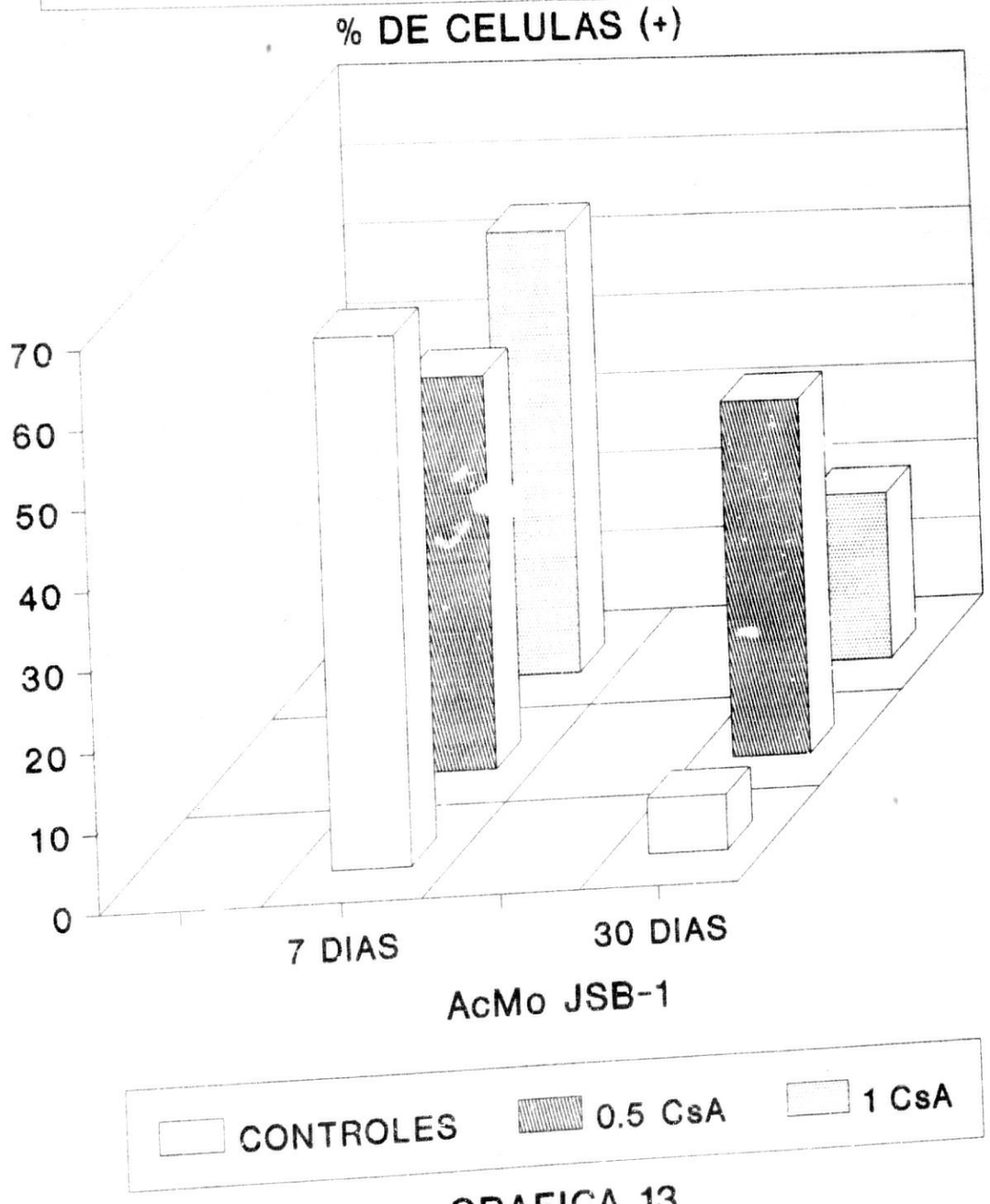
Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

Tabla 23. VALORACION DE LA EXPRESION DE GP-170 EN FUNCION DEL TIEMPO.

Tiempo (días)	GP-170 (JSB-1)	Mínimo	Máximo
7	41,55±28,66	0,5	95,2
30	22,96±18,35	0,6	68,1

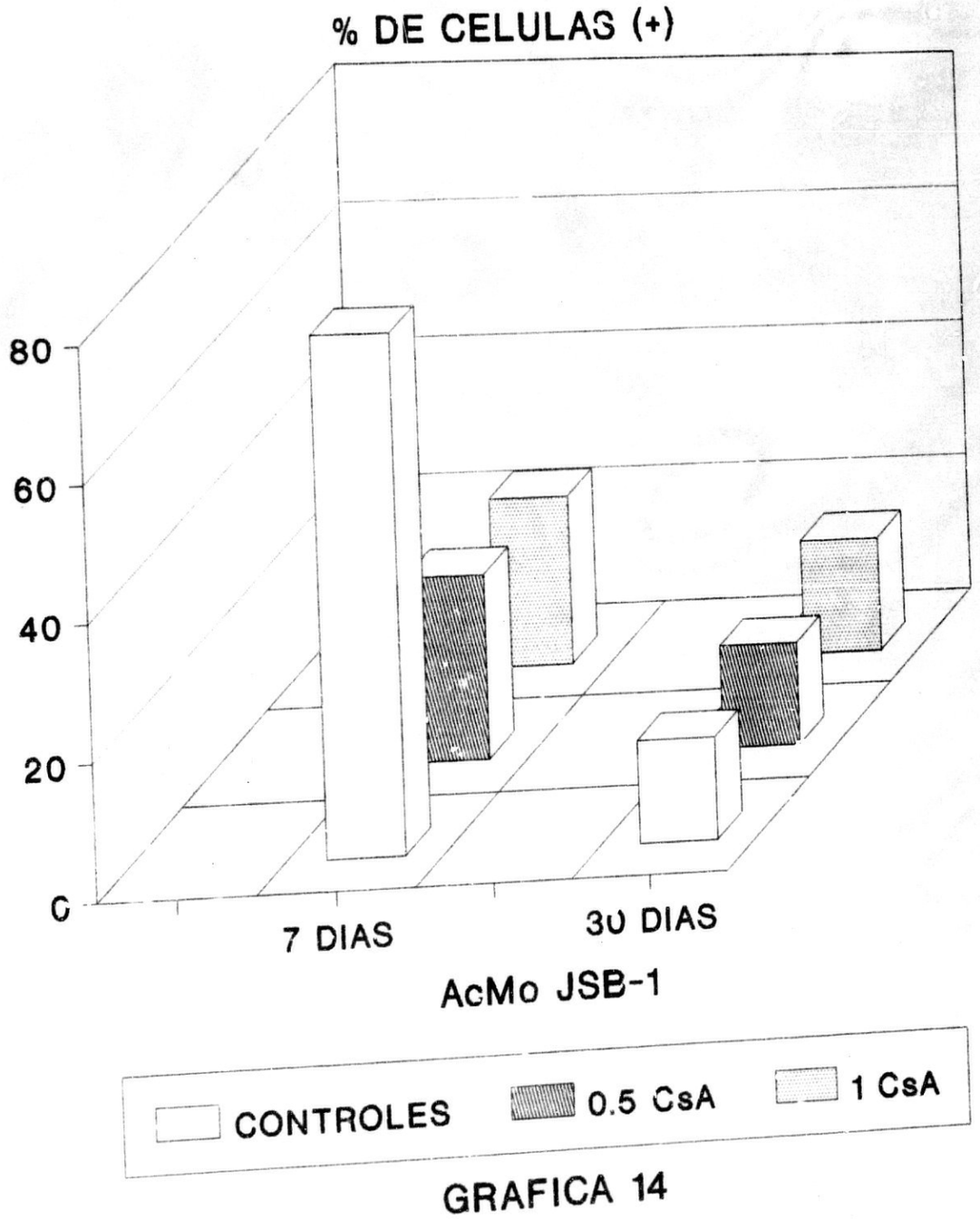
Los resultados son la media de 2 experiencias ± Desviación típica.

VALORACION DE LA EXPRESION DE P-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO EN LA LINEA CELULAR HeLa.



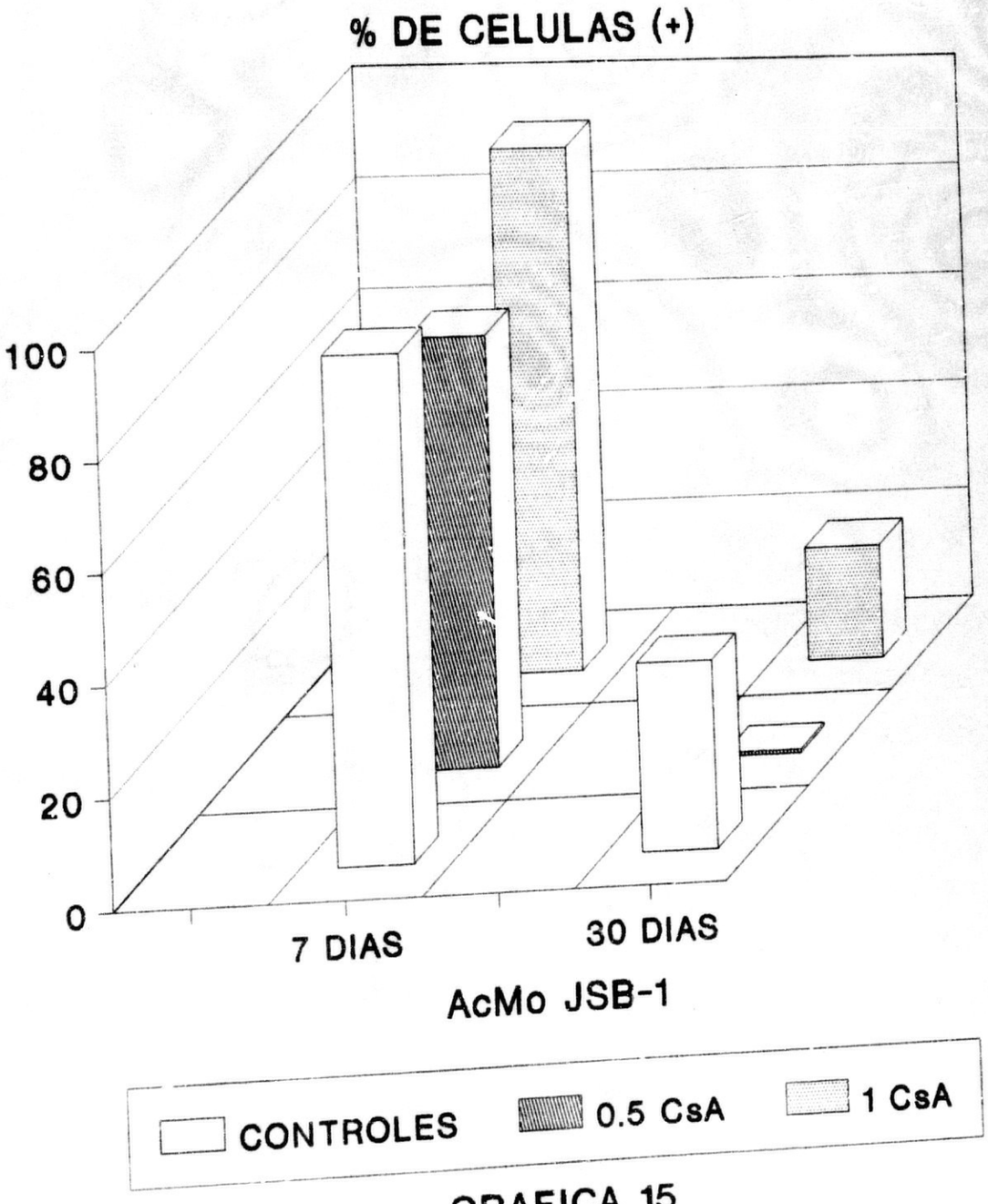
GRAFICA 13

VALORACION DE LA EXPRESION DE P-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO EN LA LINEA CELULAR MCF-7



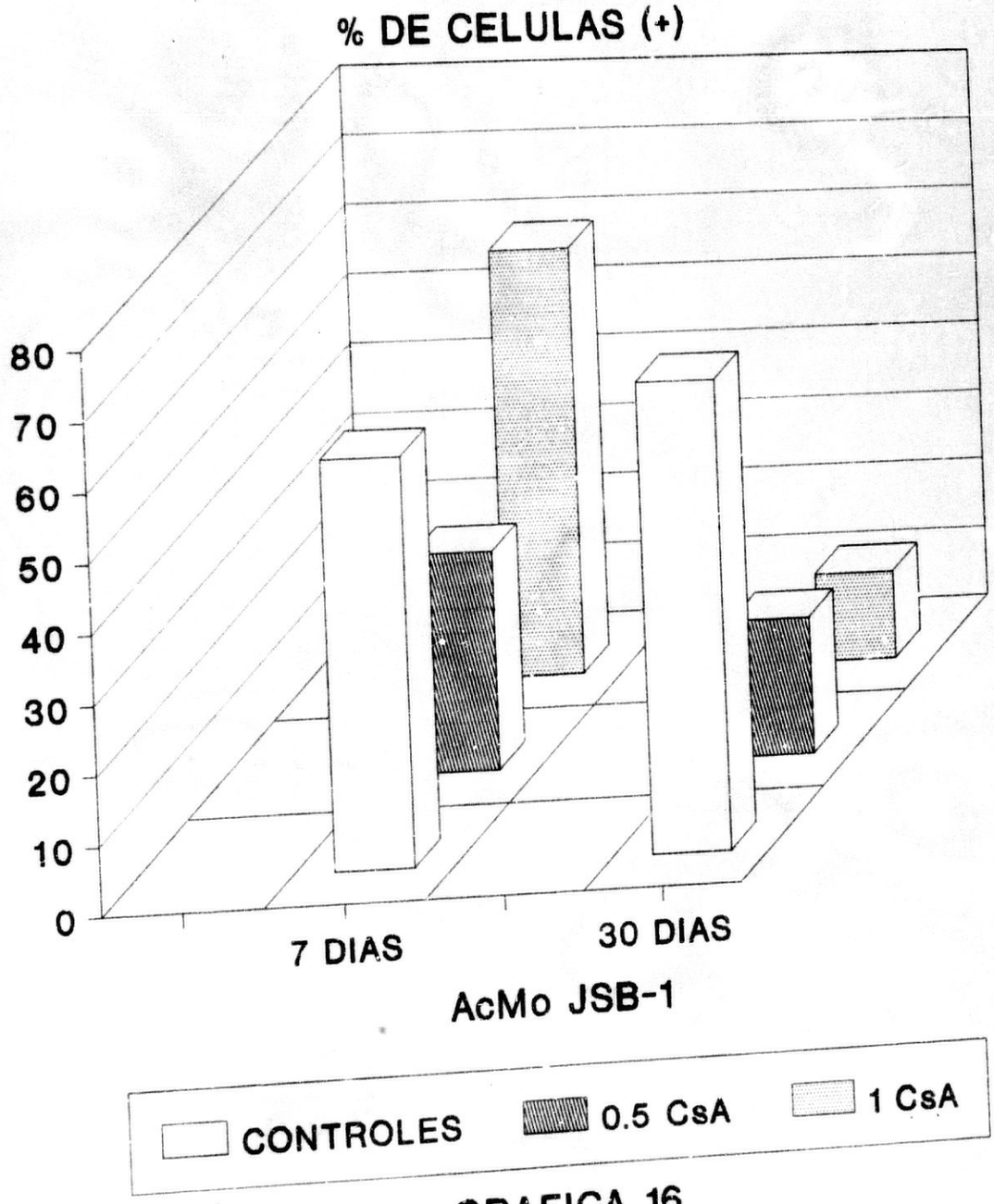
GRAFICA 14

VALORACION DE LA EXPRESION DE P-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5



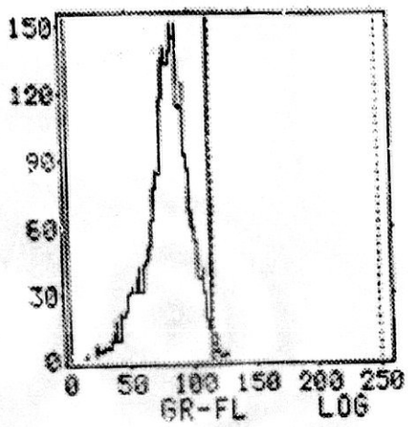
GRAFICA 15

VALORACION DE LA EXPRESION DE P-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO EN LA LINEA CELULAR B-16

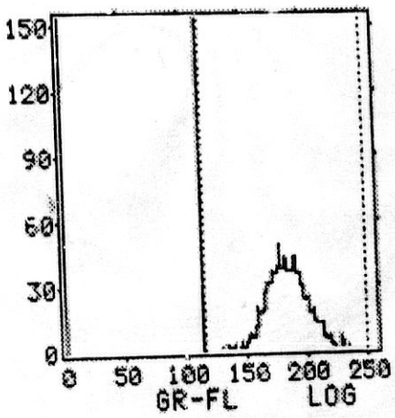


GRAFICA 16

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR HeLa SIN TRATAMIENTO



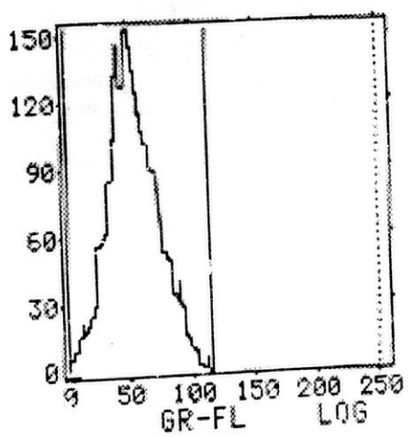
SIN AC PRIMARIO



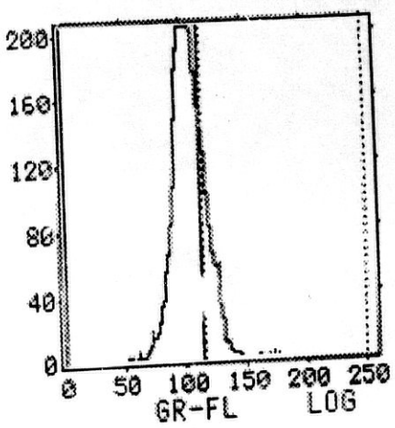
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



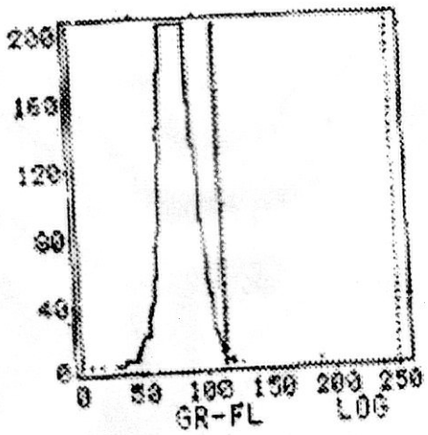
AcMo C-219



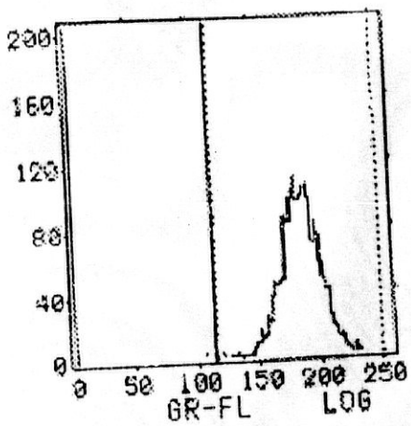
AcMo JSB-1

FIGURA:3

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR HeLa INCUBADA CON CSA [0.5 µg/ml]



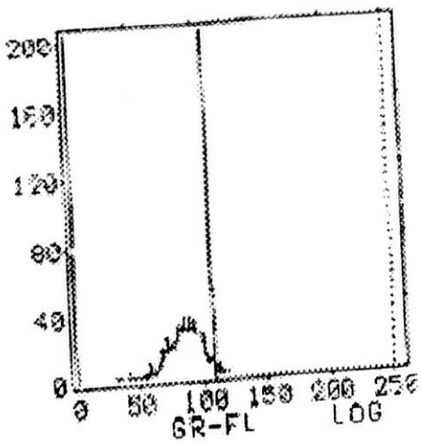
SIN AC PRIMARIO



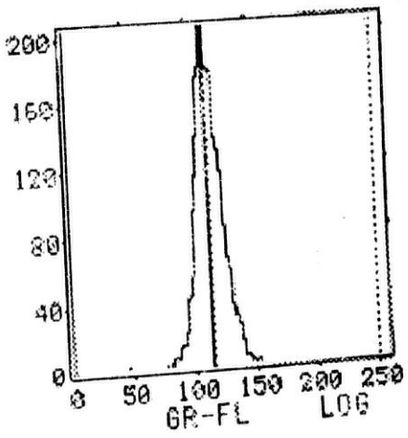
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



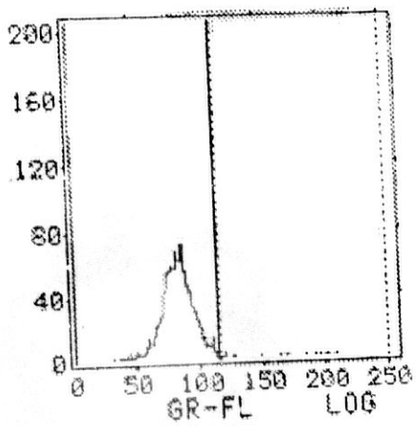
AcMo C-219



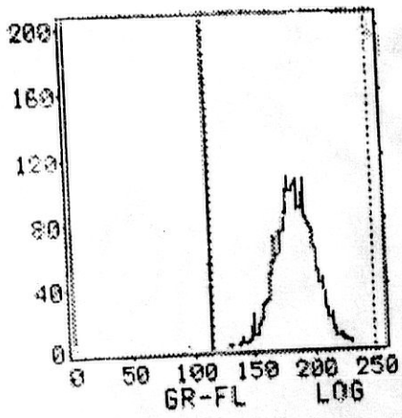
AcMo JSB-1

FIGURA:4

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR HeLa INCUBADA CON CsA [1 µg/ml]



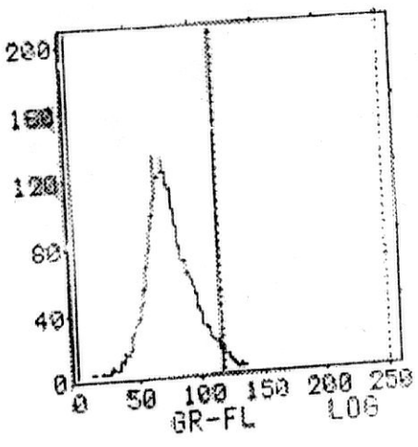
SIN AC PRIMARIO



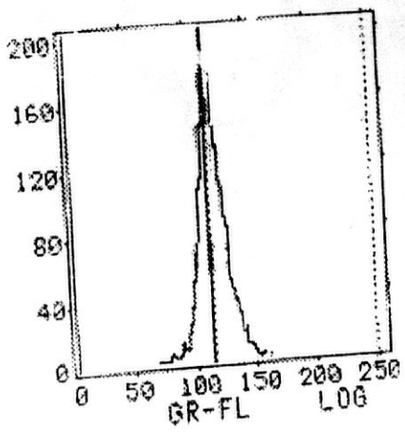
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



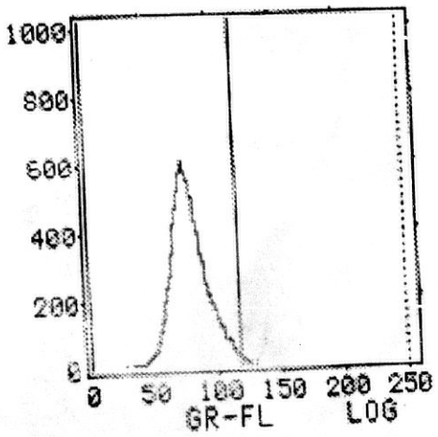
AcMo C-219



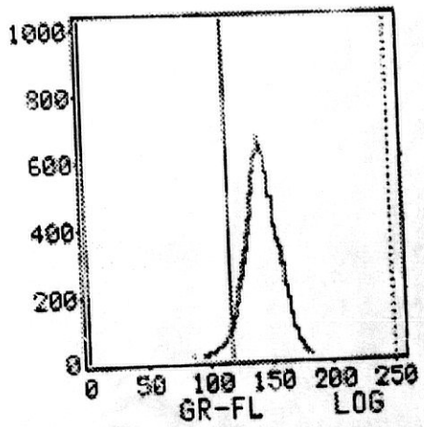
AcMo JSB-1

FIGURA:5

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR HeLa SIN TRATAMIENTO



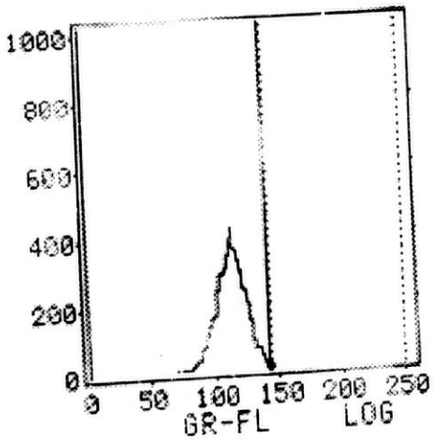
SIN AC PRIMARIO



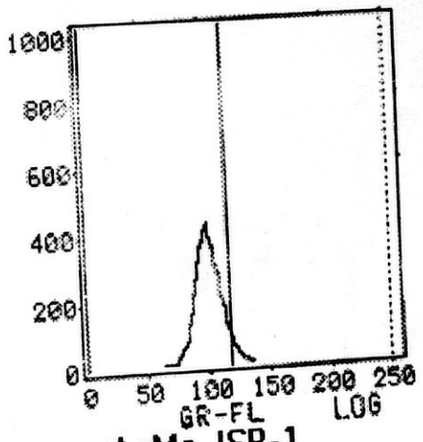
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



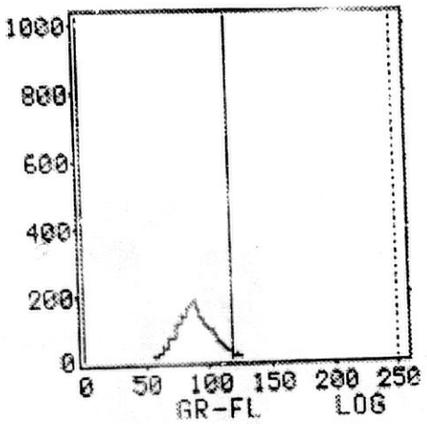
AcMo C-219



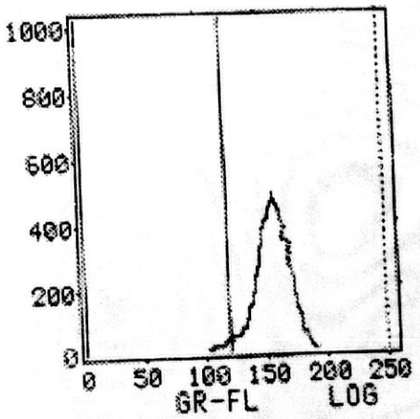
AcMo JSB-1

FIGURA:6

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR HeLa INCUBADAS CON CsA [0.5 µg/ml]



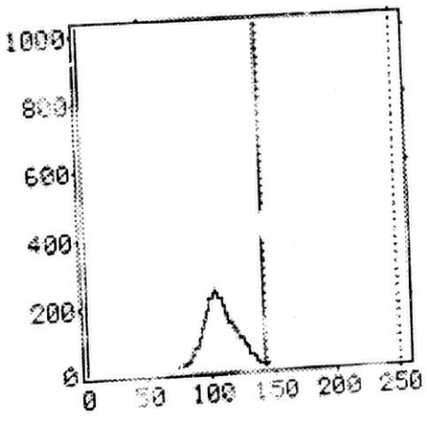
SIN AC PRIMARIO



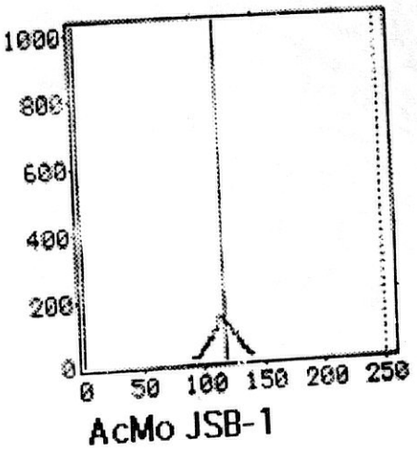
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



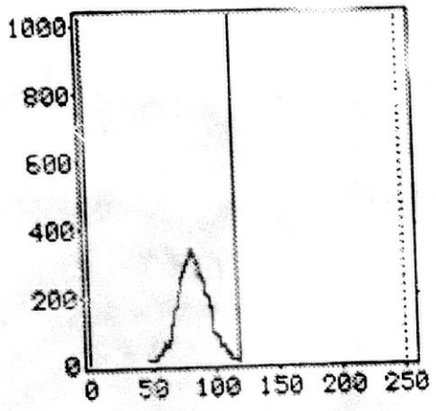
AcMo C-219



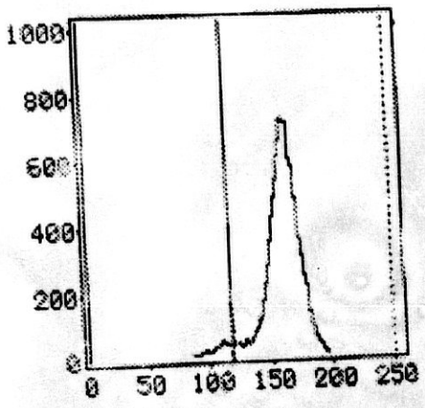
AcMo JSB-1

FIGURA:7

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR HeLa INCUBADAS CON CsA [1 µg/ml]



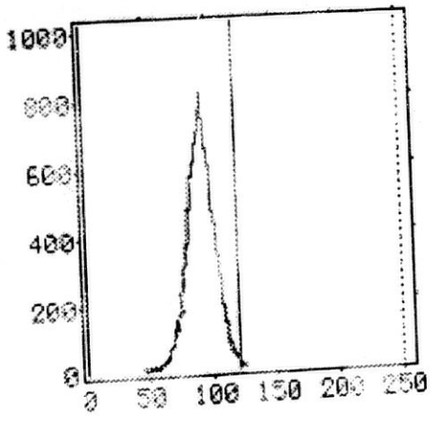
SIN AC PRIMARIO



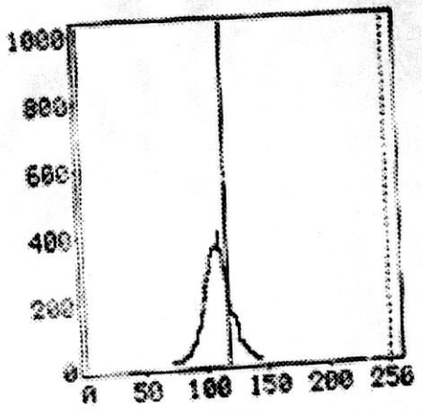
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



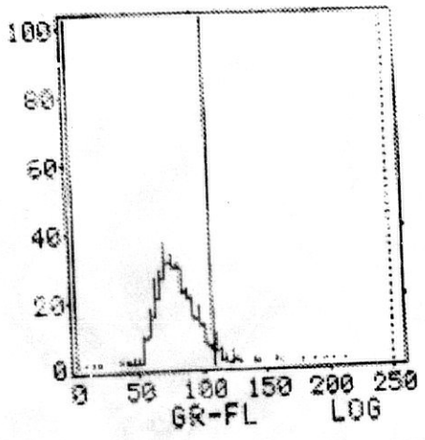
AcMo C-219



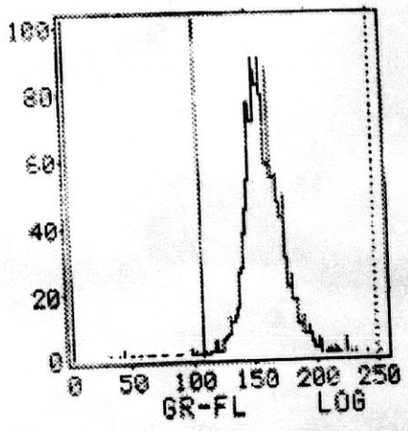
AcMo JSB-1

FIGURA:8

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR MCF-7 SIN TRATAMIENTO



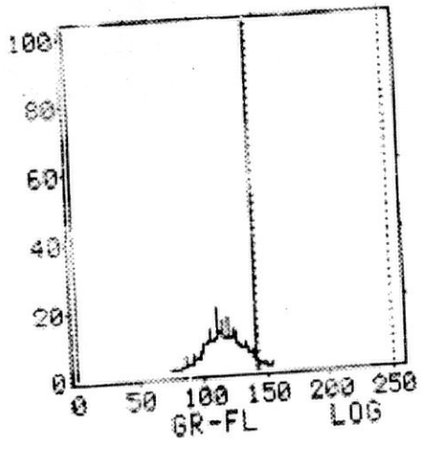
SIN AC PRIMARIO



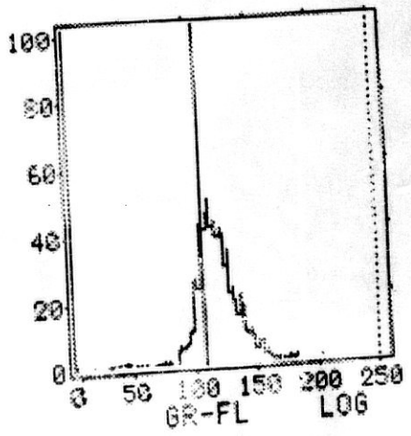
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



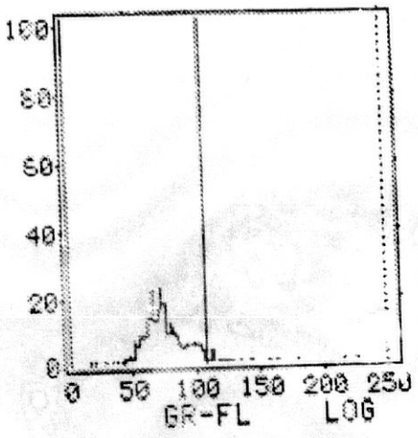
AcMo C-219



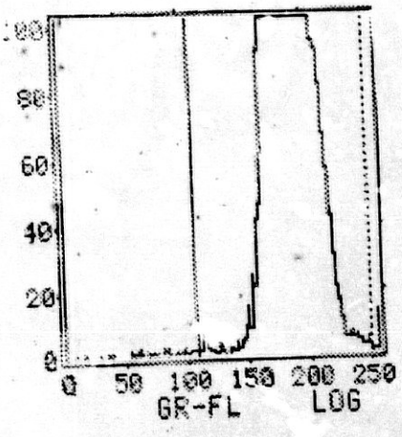
AcMo JSB-1

FIGURA:9

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR MCF-7 INCUBADAS CON CsA [0.5 µg/ml]



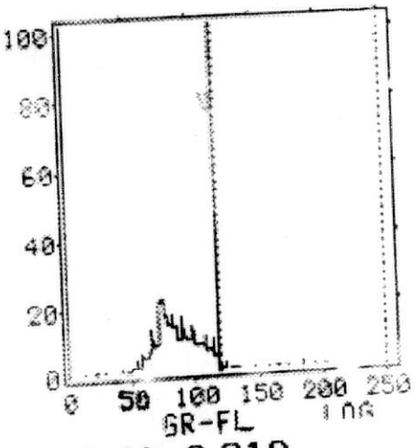
SIN AC PRIMARIO



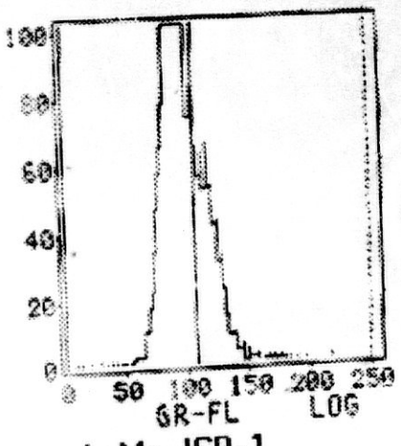
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



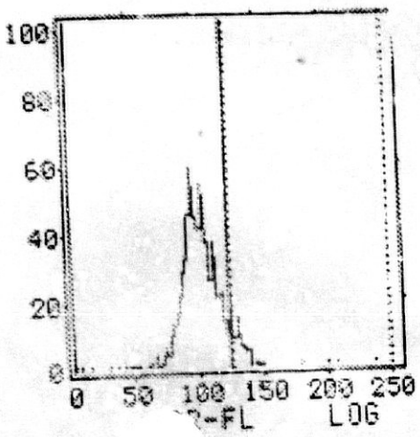
AcMo C-219



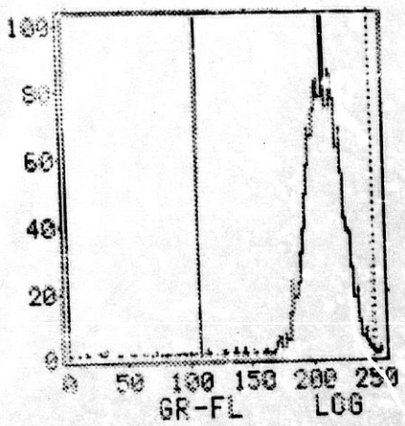
AcMo JSB-1

FIGURA: 10

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR MCF-7 INCUBADA CON CsA [1 µg/ml]



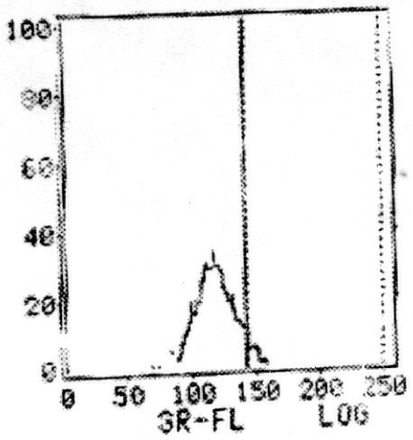
SIN AC PRIMARIO



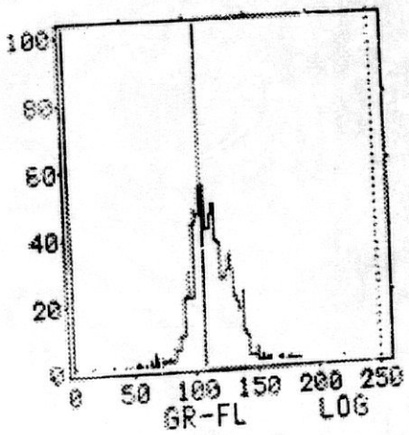
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



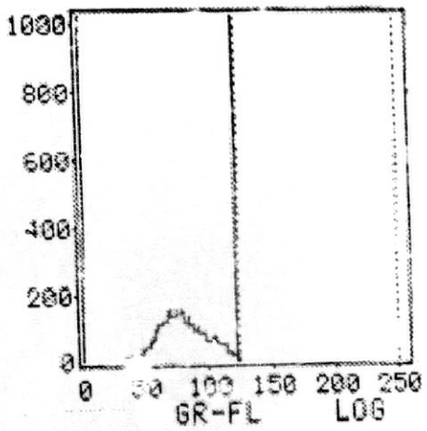
AcMo C-219



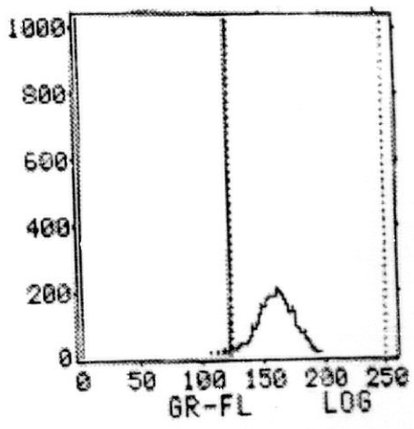
AcMo JSB-1

FIGURA: 11

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR MCF 7 SIN TRATAMIENTO



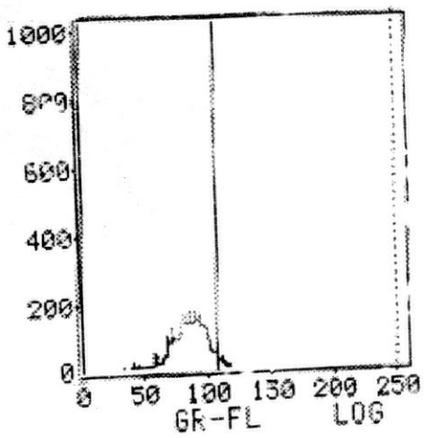
SIN AC PRIMARIO



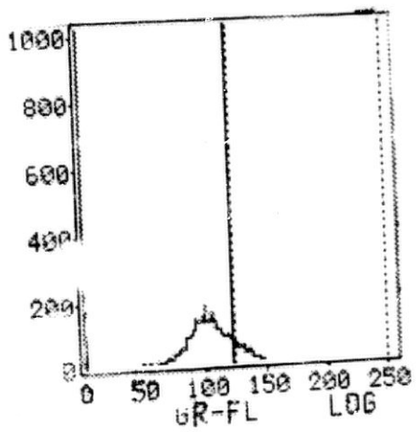
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



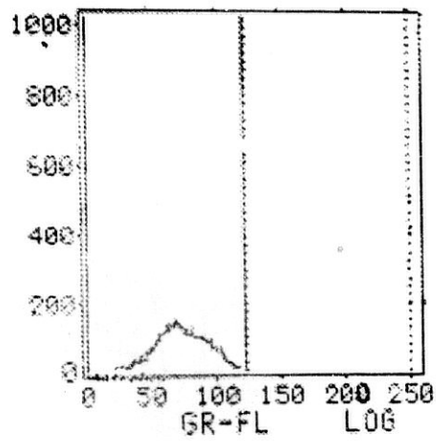
AcMo C-219



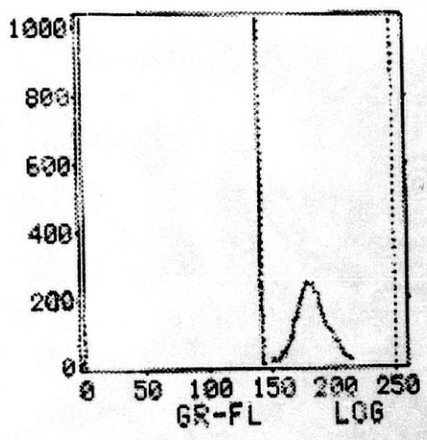
AcMo JSB-1

FIGURA:12

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR MCF-7 INCUBADAS CON CsA [0.5 µg/ml]



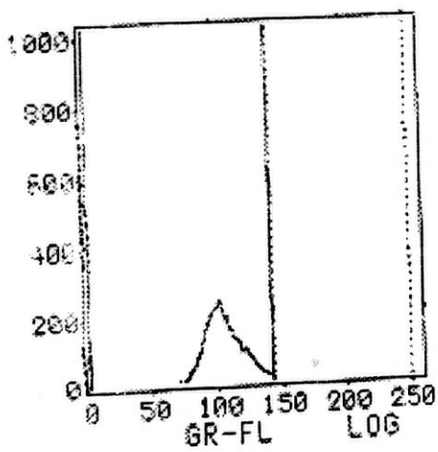
SIN AC PRIMARIO



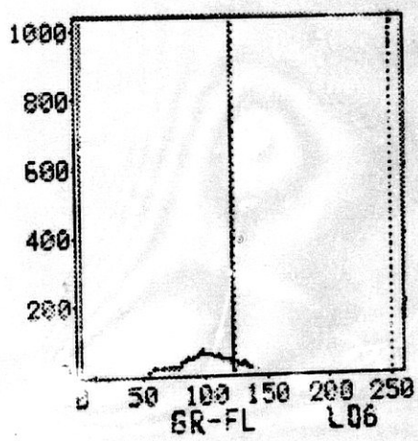
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



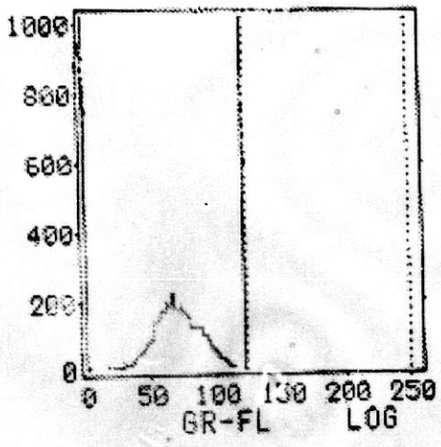
AcMo C-219



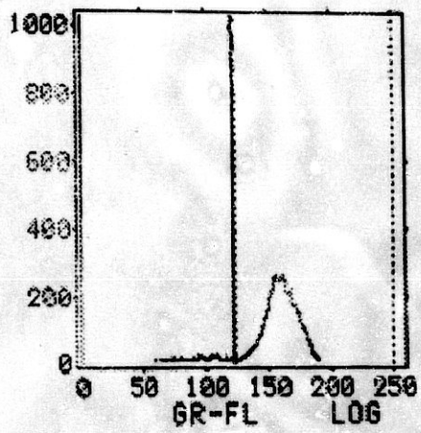
AcMo JSB-1

FIGURA: 13

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR MCF-7 INCUBADAS CON CsA [1 µg/ml]



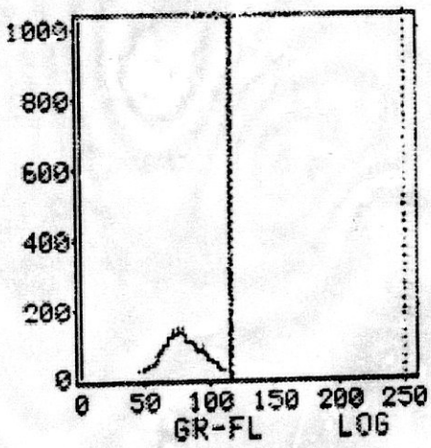
SIN AC PRIMARIO



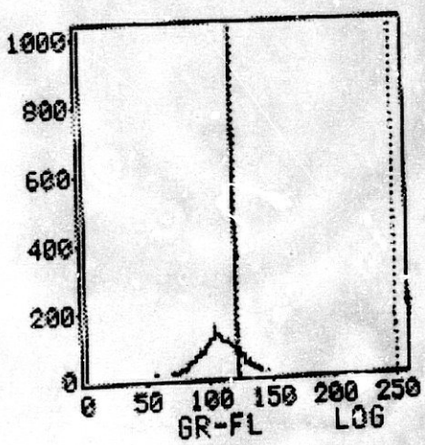
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



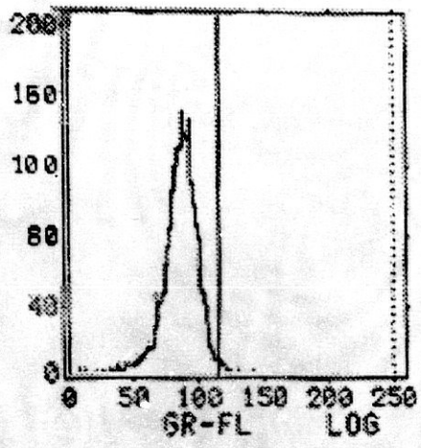
AcMo C-219



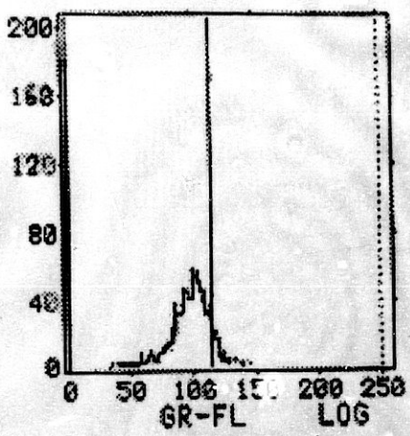
AcMo JSB-1

FIGURA:14

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 SIN TRATAMIENTO



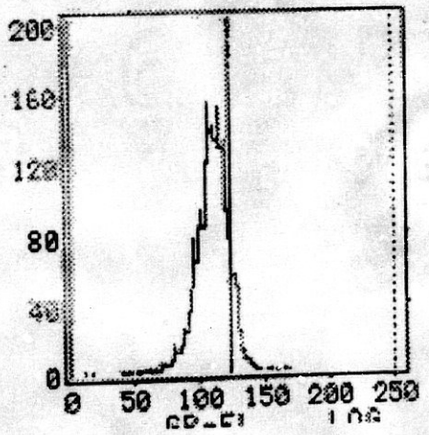
SIN AC PRIMARIO



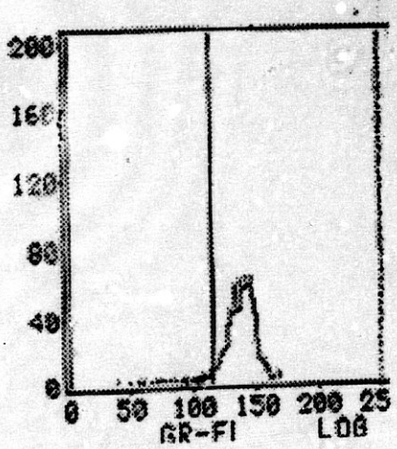
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



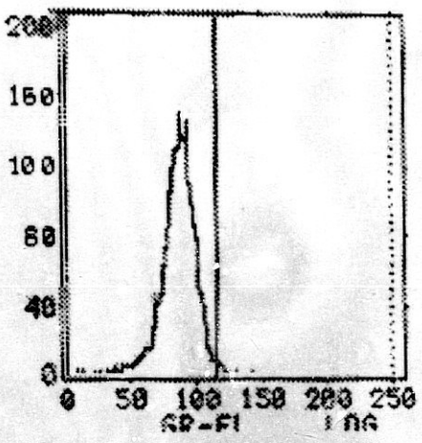
AcMo C-219



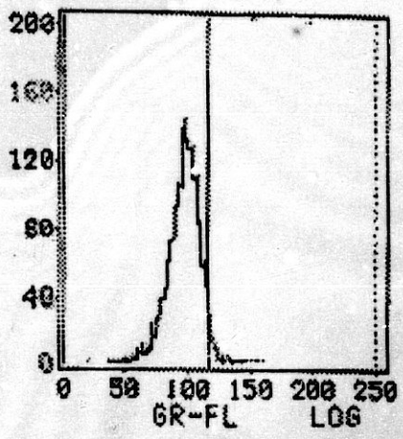
AcMo JSB-1

FIGURA:15

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 INCUBADAS CON CsA [0.5 µg/ml]



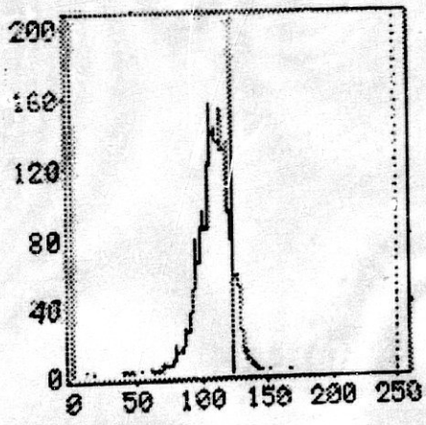
SIN AC PRIMARIO



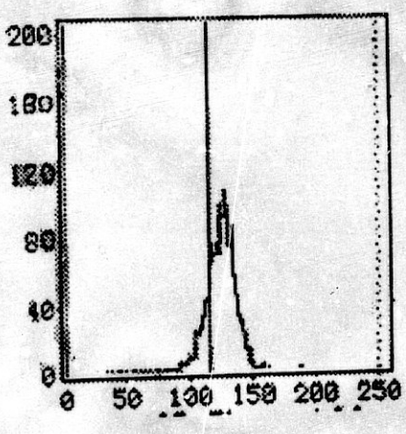
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



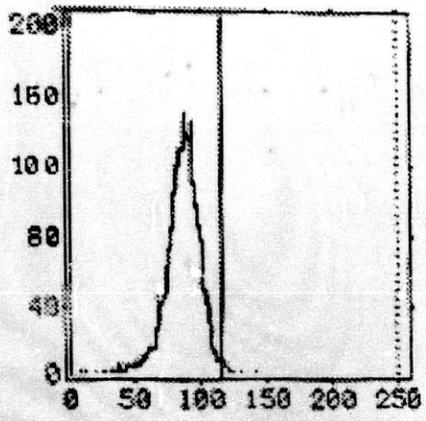
AcMo C-219



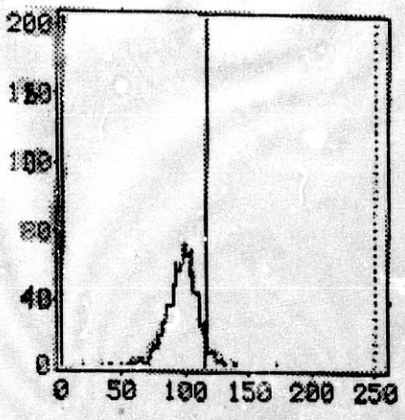
AcMo JSB-1

FIGURA:16

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 INCUBADAS CON CsA [1 µg/ml]



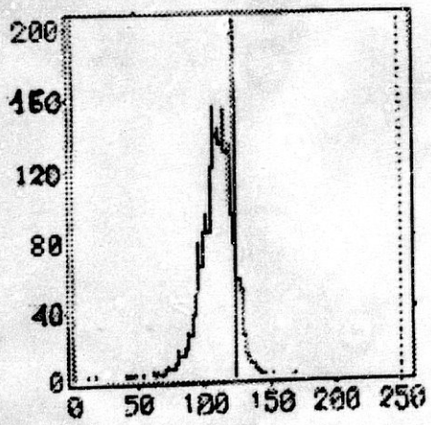
SIN AC PRIMARIO



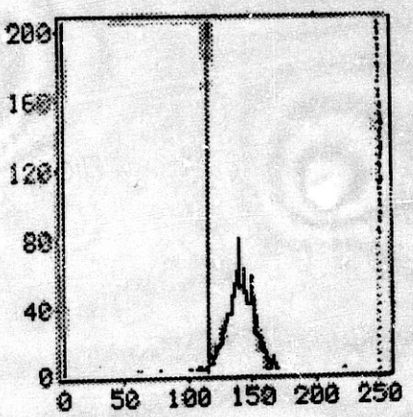
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



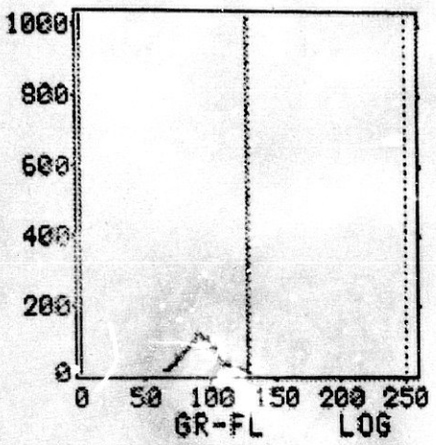
AcMo C-219



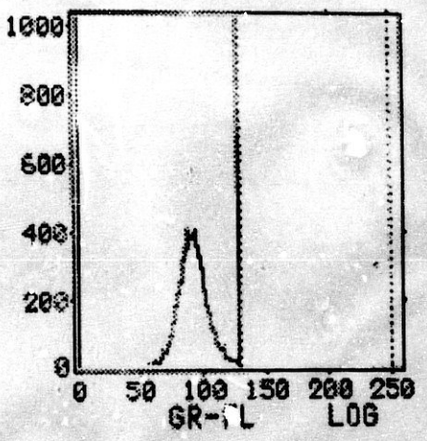
AcMo JSB-1

FIGURA:17

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 SIN TRATAMIENTO



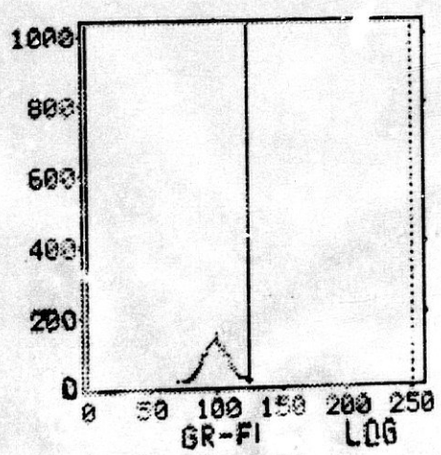
SIN AC PRIMARIO



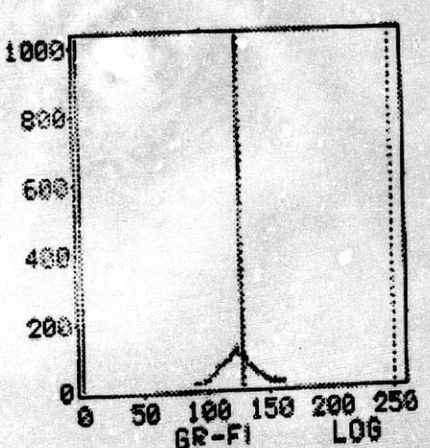
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



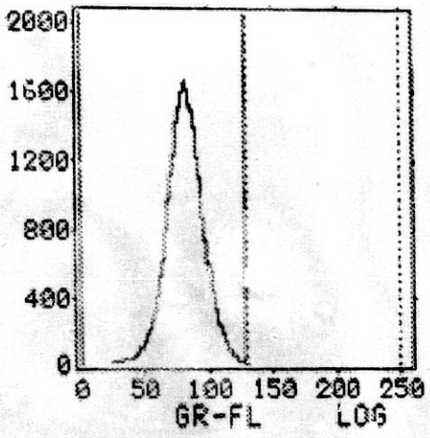
AcMo C-219



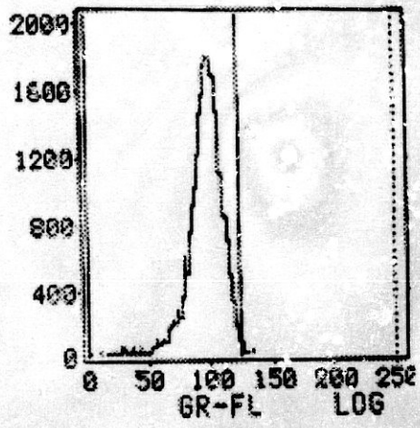
AcMo JSB-1

FIGURA:18

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 INCUBADA CON CsA [0.5 µg/ml]



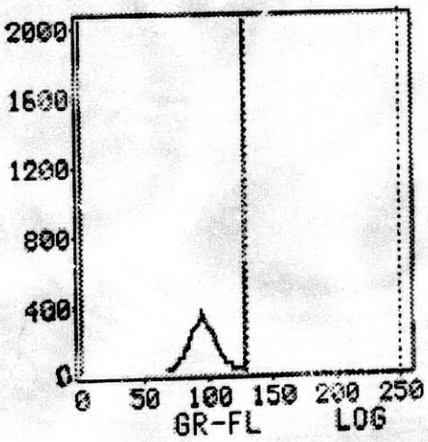
SIN AC PRIMARIO



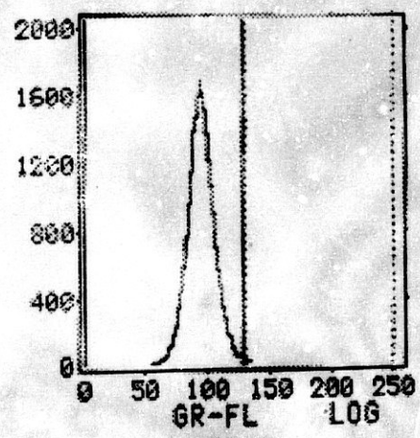
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



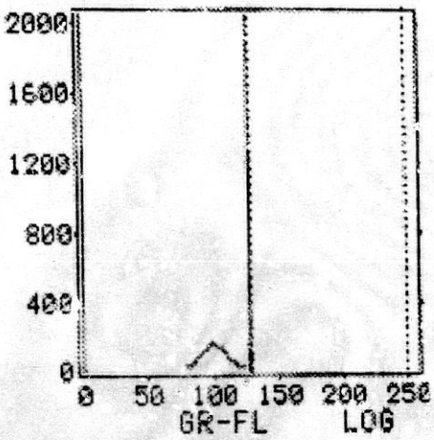
AcMo C-219



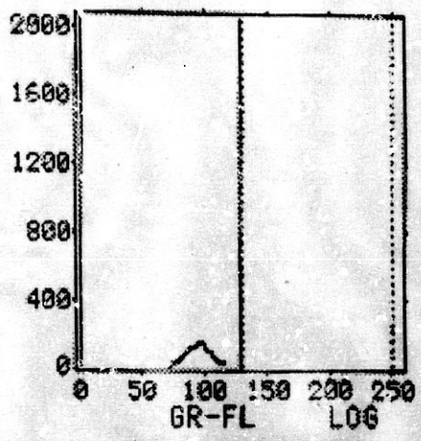
AcMo JSB-1

FIGURA:19

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR SK Mel-5 INCUBADAS CON CsA [1 µg/ml]



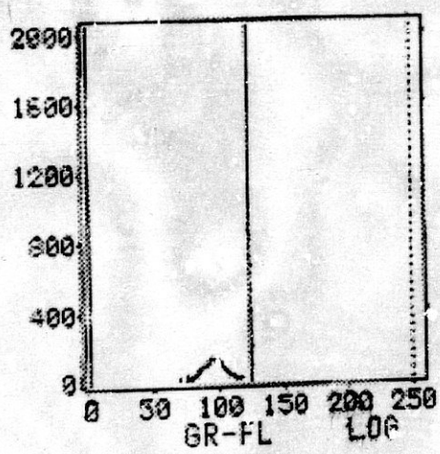
SIN AC PRIMARIO



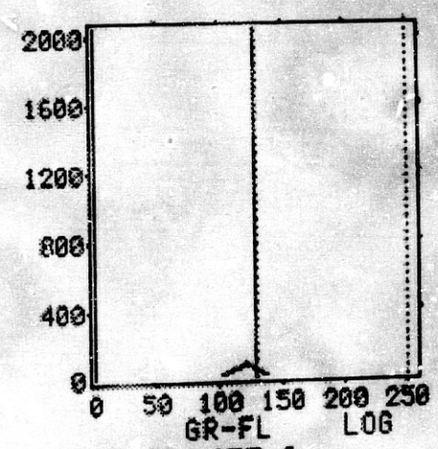
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



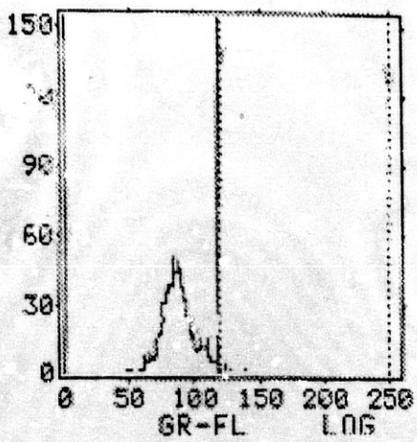
AcMo C-219



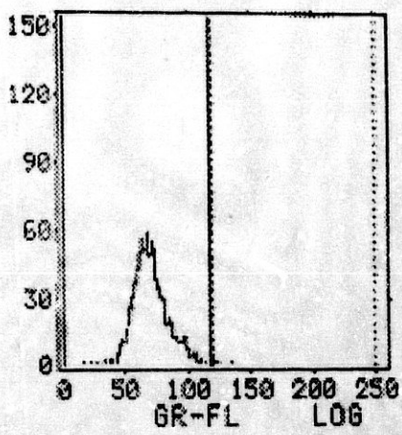
AcMo JSB-1

FIGURA:20

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR B-16 SIN TRATAMIENTO



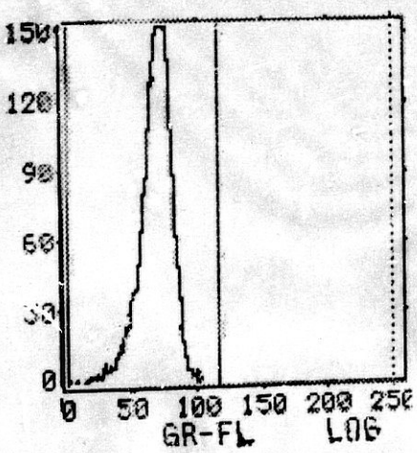
SIN AC PRIMARIO



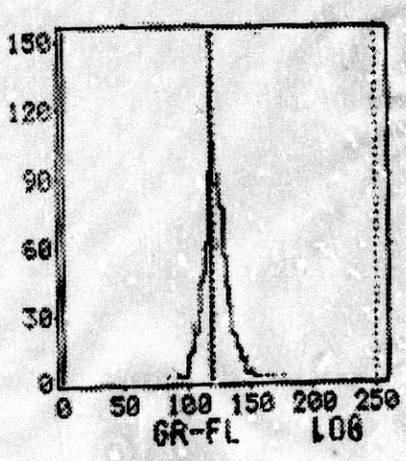
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



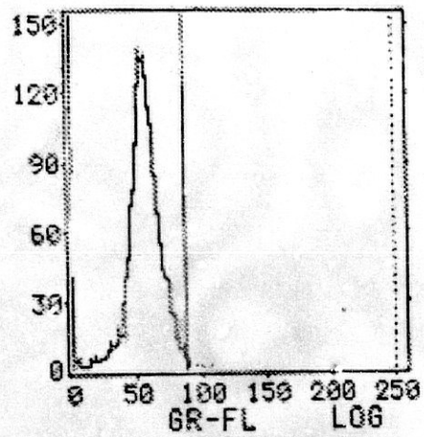
AcMo C-219



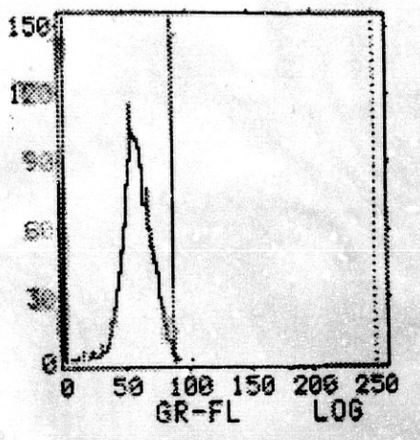
AcMo JSB-1

FIGURA:21

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR B-16 INCUBADA CON CsA [0.5µg/ml]



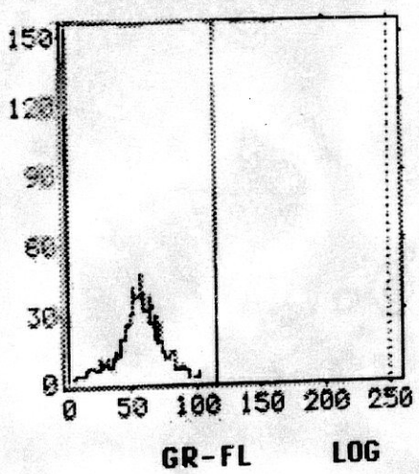
SIN AC PRIMARIO



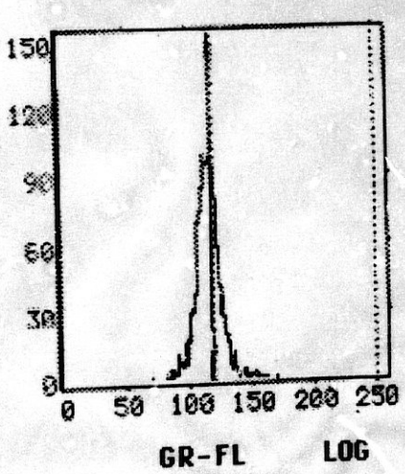
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



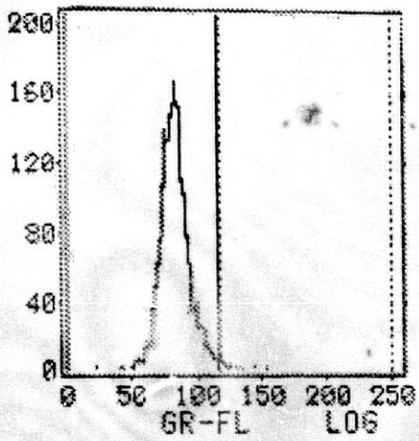
AcMo C-219



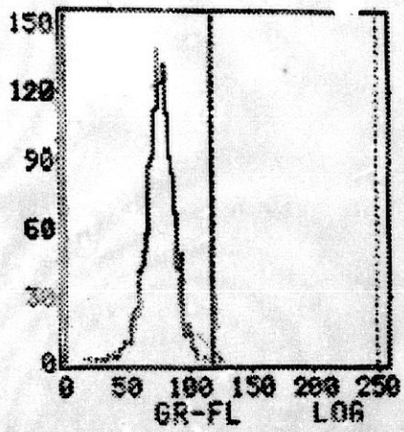
AcMo JSB-1

FIGURA:22

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR B-16 INCUBADAS CON CsA [1 µg/ml]



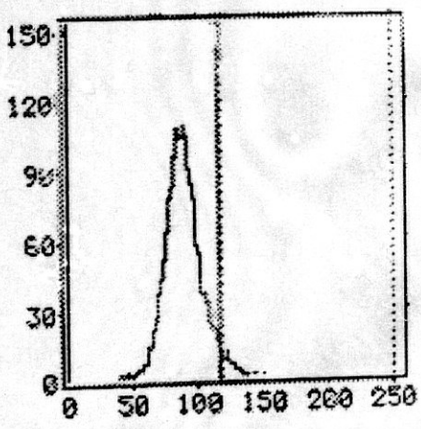
SIN AC PRIMARIO



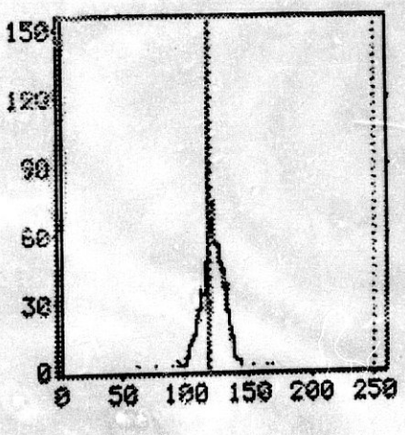
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

7 DIAS



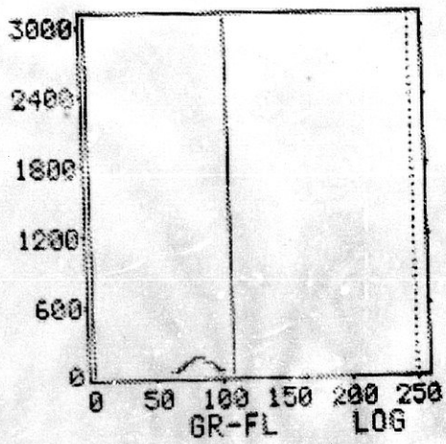
AcMo C-219



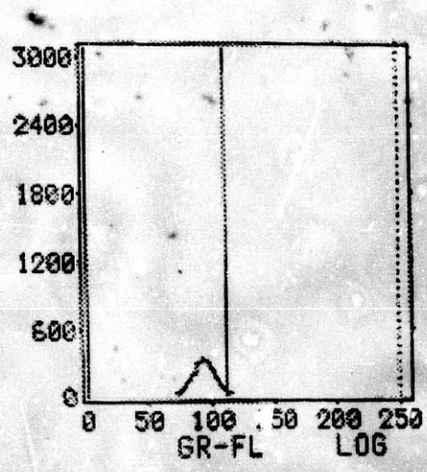
AcMo JSB-1

FIGURA:23

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR B-16 SIN TRATAMIENTO



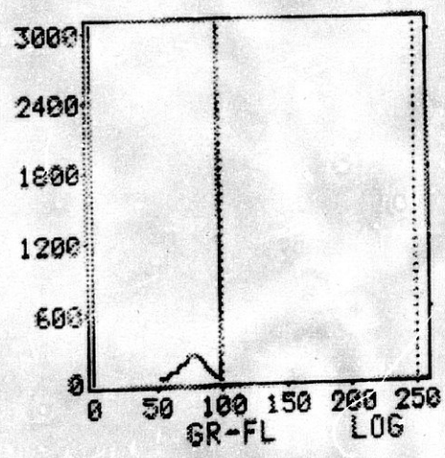
SIN AC PRIMARIO



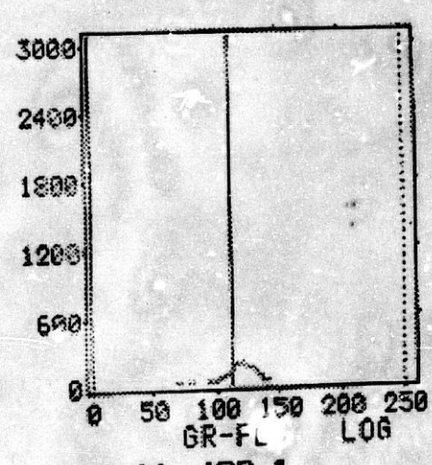
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



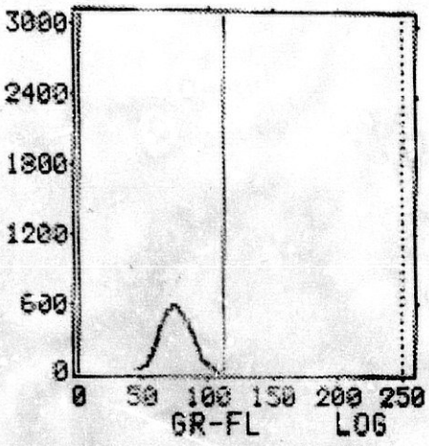
AcMo C-219



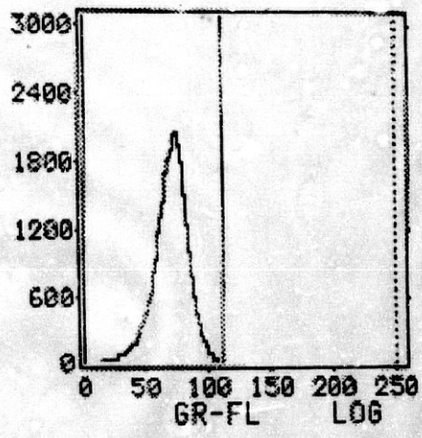
AcMo JSB-1

FIGURA: 24

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN LA LINEA CELULAR B-16 INCUBADAS CON CsA [0.5 µg/ml]



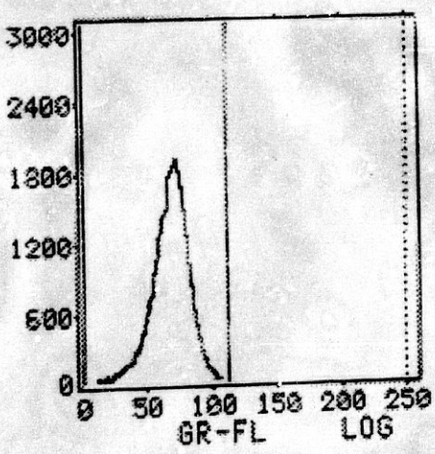
SIN AC PRIMARIO



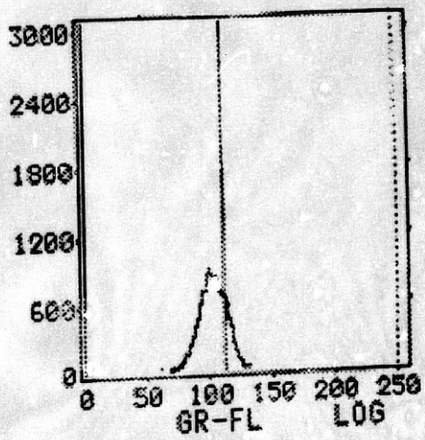
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



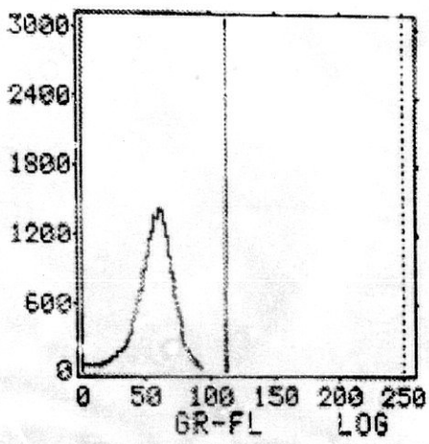
AcMo C-219



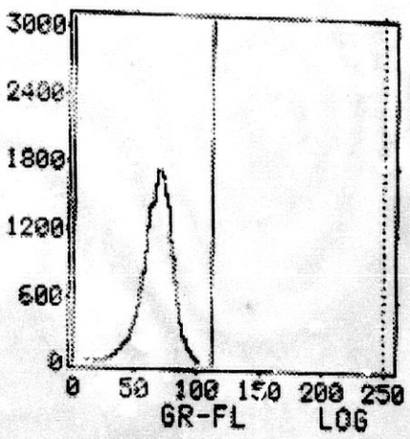
AcMo JSB-1

FIGURA:25

VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICa MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO, EN La LINEA CELULAR B-16 INCUBADAS CON Csa [1 µg/ml]



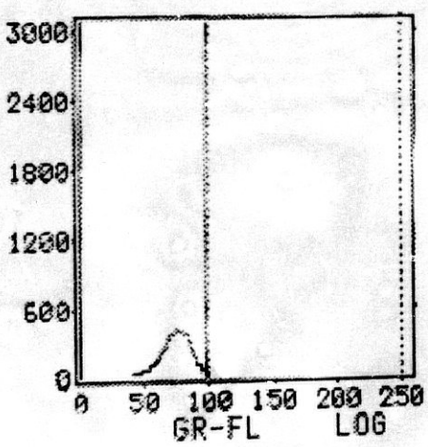
SIN AC PRIMARIO



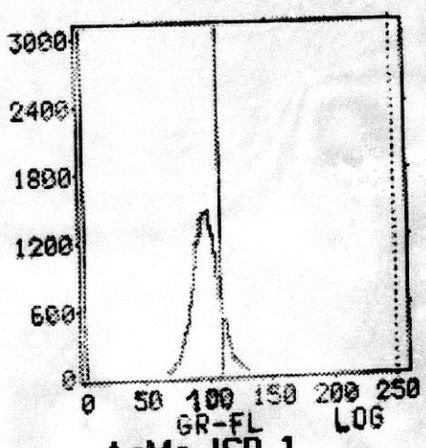
CITOQUERATINA

EXPRESION DE GP-170

30 DIAS



AcMo C-219



AcMo JSB-1

FIGURA:26

III–4.- RESULTADOS DEL ANALISIS DE IMAGEN SOBRE LOS CULTIVOS CELULARES.

De forma genérica y tras realizar la captación interactiva de las imágenes nucleares, que son presentadas por el sofware TEXCAN en pantallas de 25 imágenes digitales (Ilustración 5), se procede a su transformación mediante filtrado e inversión digital en imagen de densidad óptica integrada (Ilustración 6), que es umbralizada (segmentada) mediante un procedimiento interactivo hasta obtener una máscara de segmentación que define nítidamente el perfil nuclear utilizado para la valoración morfométrica y una imagen densitométrica del contenido (en blanco) que contrasta con el fondo en negro (imagen binaria) (Ilustración 7). Con la finalidad de facilitar la distinción entre las imágenes correspondientes a las diferentes líneas, es posible asignar a cada imagen digital un loot de color diferente que permite su separación sencilla (Ilustración 8).

En el caso del estudio granulométrico, la aplicación del correspondiente subprograma de TEXCAN, permite diferenciar entre el contenido nuclear en granos finos (Ilustración 9) y gruesos (Ilustración 10) de heterocromatina.

III–4.1.- RESULTADOS DE CUANTIFICACION MORFOMETRICA.

Los resultados obtenidos de la evaluación morfométrica de los núcleos celulares, correspondientes a las diferentes líneas testificadas, evidencian una modificación de alguno de los parámetros, en particular, los concernientes al área nuclear y relacionados con ella, como son el perímetro y diámetro del mismo, cuando son sometidos los cultivos al efecto de CsA a concentración de 1 µg/ml (tablas 24, 25, 26, 27).

Hemos comprobado varios tipos de respuestas adaptativas tras la incubación con CsA. Por un lado una disminución del tamaño nuclear estadísticamente significativa ($p<0.001$, t de Student) (Gráficas 18a, 20a) en las líneas celulares **MCF–7** (2555±905 vs 1638±574) y **B–16** (2490±617 vs 1669±375), significación que también comparten el perímetro y el diámetro nuclear. La respuesta evidenciada en la línea celular de melanoma humano **SK Mel–5**, es por el contrario, un incremento de los parámetros mencionados (Tabla 26) consiguiéndose también significación estadística para dichos valores (2998±590 vs 3570±766 $p<0.001$, t de Student) (Gráfica 19a). De esta tendencia observada, se separa la línea celular de carcinoma **HeLa**, en la que no se ha podido demostrar modificación estadísticamente significativa alguna (Tabla 24) (3063±585 vs 3247±658) en los parámetros evaluados (Gráfica 17a).

También, ha sido constante la ausencia de modificacion, en las líneas celulares de todos los parámetros de forma como son el factor de esfericidad, regularidad, elongación y asimetría (Tablas 24, 25, 26, 27) (Gráficas 17b, 18b, 19b, 20b).

Establecida la comparación con células mesenquimales normales (RSO1) (Tabla 28) se constata que el tamaño nuclear de las líneas tumorales es mayor, con una significación estadística que oscila entre $p<0.01$ y $p<0.001$ con el test de comparación múltiple de medias (gráfica 21) y una vez tratadas las monocapas celulares con CsA, las células que se mantienen en el cultivo presentan un área nuclear menor que la células mesenquimales normales (caso de las líneas MCF-7 y B-16), incrementan su tamaño (línea SK Mel-5) o se modifican (línea HeLa) (Gráfica 21).

Tabla 24. ESTUDIO MORFOMETRICO DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA HeLa.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]
AREA CELULAR	3136±585	3247±658
PERIMETRO	247±24	274±29
RADIO	31,4	32
FACTOR DE ESFERICIDAD	0,98	0,98
FACTOR DE REGULARIDAD	1,78	2,04
FACTOR DE ELONGACION	0,05	0,04
FACTOR DE ASIMETRIA	0,21	0,21

* Los valores corresponden a la media ± desviación típica de 100 células.

Tabla 25. ESTUDIO MORFOMETRICO DE LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]
AREA CELULAR	2555±905	1638±574
PERIMETRO	232±50	206±33
RADIO	28,1	22,5
FACTOR DE ESFERICIDAD	0,98	0,99
FACTOR DE REGULARIDAD	1,66	1,54
FACTOR DE ELONGACION	0,05	0,04
FACTOR DE ASIMETRIA	0,27	0,32

* Los valores corresponden a la media ± desviación típica de 100 células.

Tabla 26. ESTUDIO MORFOMETRICO DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK Mel-5

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]
AREA CELULAR	2998±590	3570±766
PERIMETRO	252±26	268±31
RADIO	32	34
FACTOR DE ESFERICIDAD	0,97	0,99
FACTOR DE REGULARIDAD	1,62	1,75
FACTOR DE ELONGACION	0,05	0,05
FACTOR DE ASIMETRIA	0,23	0,24

* Los valores corresponden a la media ± desviación típica de 100 células.

Tabla 27. ESTUDIO MORFOMETRICO DE LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]
AREA CELULAR	2490±617	1581±375
PERIMETRO	230±30	202±23
RADIO	25,9	22,3
FACTOR DE ESFERICIDAD	0,98	1
FACTOR DE REGULARIDAD	1,94	1,83
FACTOR DE ELONGACION	0,05	0,04
FACTOR DE ASIMETRIA	0,21	0,26

* Los valores corresponden a la media ± desviación típica de 100 células.

Tabla 28. ESTUDIO MORFOMETRICO DE LAS CELULAS MESENQUIMALES NORMALES RSO1.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]
AREA CELULAR	2072±760	N.D.
PERIMETRO	206±36	N.D.
RADIO	25,4	N.D.
FACTOR DE ESFERICIDAD	0,99	N.D.
FACTOR DE REGULARIDAD	2,30	N.D.
FACTOR DE ELONGACION	0,05	N.D.
FACTOR DE ASIMETRIA	0,22	N.D.

* Los valores corresponden a la media ± desviación típica de 100 células.

N.D.: No determinado.

III-4.2.- RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE LA TEXTURA GRANULAR.

Los valores resultantes de la cuantificación de la textura granular de los núcleos seleccionados con los filtros de mediana (5x5) o granularidad nuclear fina y (11x11) o granularidad nuclear gruesa para cada línea celular se expresan en las tablas 29, 30, 31, 32.

De estos resultados cabe destacar como la CsA a concentración de 1 µg/ml, no ocasiona ninguna modificación para los parámetros estudiados sobre la línea celular de carcinoma **HeLa**, comparada con las células control (Tabla 29).

En relación con la línea celular de melanoma humano **SK Mel-5**, hemos comprobado que la modificación producida en la textura granular por la CsA, es principalmente originada en la cromatina dispuesta en gruesos acúmulos, aumentando tanto el número de gránulos como la extensión ocupada por ellos ($p<0,01$, t de Student) (Tabla 31), no siendo significativos los cambios en la textura granular fina.

La variación de la textura granular de las células **MCF-7** y **B-16** después de ser tratadas con 1 µg/ml es semejante, con un incremento del área media granular de la hetrocromatina de carácter estadísticamente significativo, junto con un aumento del área granular gruesa y un descenso del la granularidad fina, que no alcanza significación estadística debido a la gran variación entre células (Tablas 30 y 32). En general como se puede observar en las tablas, la tendencia es al aumento de la heterocromatina y descenso de la eucromatina con mayor o menor grados de significación, evaluado por el Test de Student.

Establecida la comparación entre las celulas mesenquimales control (Tabla 33) y la línea celular HeLa, es manifiesto el aumento del área granular fina tras el tratamiento con CsA ($p<0,01$, t de Student) y la reducción del área granular gruesa (Gráfica 22). Por el contrario, el comportamiento de la línea más sensible **SK Mel-5** es inverso, aumentando principalmente la cromatina dispuesta en gruesos acúmulos ($p<0,01$, t de Student) (Gráfica 22).

Tabla 29. ESTUDIO DE LA TEXTURA GRANULAR EN LA LINEA DE CARCINOMA Hela.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]	NIV. SIG.
Nº DE GRANULOS			**
G. FINOS	60,1±19,9	74,95±33,4	p<0,1
G.GRUESOS	1,95±3,3	0,95±1,7	NO SIG.
AREA GRANULAR			
G. FINOS	225,3±73,4	282,65±128	p<0,1
G.GRUESOS	86,3±189	33,90±69,2	NO SIG.
AREA TOTAL GRANULOS/AREA			
G. FINOS	20,6±6,6	20,8±8,8	NO SIG.
G. GRUESOS	0,55±4,1	0,35±0,7	NO SIG.
Nº GRANULOS/CELULA			
G. FINOS	7,6±2,1	7,8±3,4	NO SIG.
G. GRUESOS	3,2±6,7	1,3±2,8	NO SIG.
AREA MEDIA GRANULAR			
G. FINOS	1,15±0,3	1,1±0,4	NO SIG.
G.GRUESOS	6,4±7,0	3,9±6,3	NO SIG.

* Los valores corresponden a la media de 100 células.

** Nivel de significación para la t de Student.

Tabla 30. ESTUDIO DE LA TEXTURA GRANULAR EN LA LINEA DE CARCINOMA DE MAMA MCF-7.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]	NIV. SIG.
Nº DE GRANULOS			**
G. FINOS	27,0±22,5	27,0±13,1	NO SIG.
G.GRUESOS	5,1±6,0	4,3±3,8	NO SIG.
AREA GRANULAR			
G. FINOS	135,4±96,3	126,8±65	NO SIG.
G.GRUESOS	273,8±412	415,6±366	NO SIG.
AREA TOTAL GRANULOS/AREA			
G. FINOS	11,2±6,4	14,5±5,8	p<0,1
G. GRUESOS	1,8±1,9	2,3±2,0	NO SIG.
Nº GRANULOS/CELULA			
G. FINOS	4,6±2,7	7,5±3,5	p<0,01
G. GRUESOS	8,6±10,6	23,3±19,7	p<0,01
AREA MEDIA GRANULAR			
G. FINOS	1,3±0,5	2,7±1,1	p<0,001
G.GRUESOS	9,9±9,5	56,7±104	p<0,1

* Los valores corresponden a la media de 100 células.

** Nivel de significación para la t de Student.

Tabla 31. ESTUDIO DE LA TEXTURA GRANULAR EN LA LINEA DE MELANOMA HUMANO SK Mel-5.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]	NIV. SIG.
Nº DE GRANULOS			**
G. FINOS	32,9±23	32,7±17	NO SIG.
G.GRUESOS	0,0±0,0	2,6±31	p<0,01
AREA GRANULAR			
G. FINOS	123,5±83,2	129,6±80,8	NO SIG.
G.GRUESOS	0,0±0,0	140,4±182,9	p<0,01
AREA TOTAL GRANULOS/AREA			
G. FINOS	10,6±6,8	8,2±4,4	NO SIG.
G. GRUESOS	0,0±0,0	0,7±0,9	p<0,01
Nº GRANULOS/CELULA			
G. FINOS	4,0±2,5	3,3±1,8	NO SIG.
G. GRUESOS	0,0±0,0	2,6±4,7	p<0.01
AREA MEDIA GRANULAR			
G. FINOS	1,2±0,5	1,0±0,0	NO SIG
G.GRUESOS	0,0±0,0	6,8±7,4	p<0,001

* Los valores corresponden a la media de 100 células.

** Nivel de significación para la t de Student.

Tabla 32. ESTUDIO DE LA TEXTURA GRANULAR EN LA LINEA DE MELANOMA MURINO B-16.

PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]	NIV. SIG.
Nº DE GRANULOS			**
G. FINOS	44,4±15,1	33±7,7	p<0,01
G.GRUESOS	6,1±4,2	5,3±2,8	NO SIG.
AREA GRANULAR			
G. FINOS	195,4±67	134±32	p<0,001
G.GRUESOS	427,0±352	384±219	NO SIG.
AREA TOTAL GRANULOS/AREA			
G. FINOS	16,4±4	21,9±4,4	p<0,001
G. GRUESOS	2,4±1,6	3,7±1,7	p<0,05
Nº GRANULOS/CELULA			
G. FINOS	7,4±1,8	8,8±1,8	p<0,05
G. GRUESOS	17,2±14,4	26,0±13,5	p<0,1
AREA MEDIA GRANULAR			
G. FINOS	1,7±0,5	2,7±0,7	p<0,001
G.GRUESOS	23,9±28,8	46,9±27	p<0,05

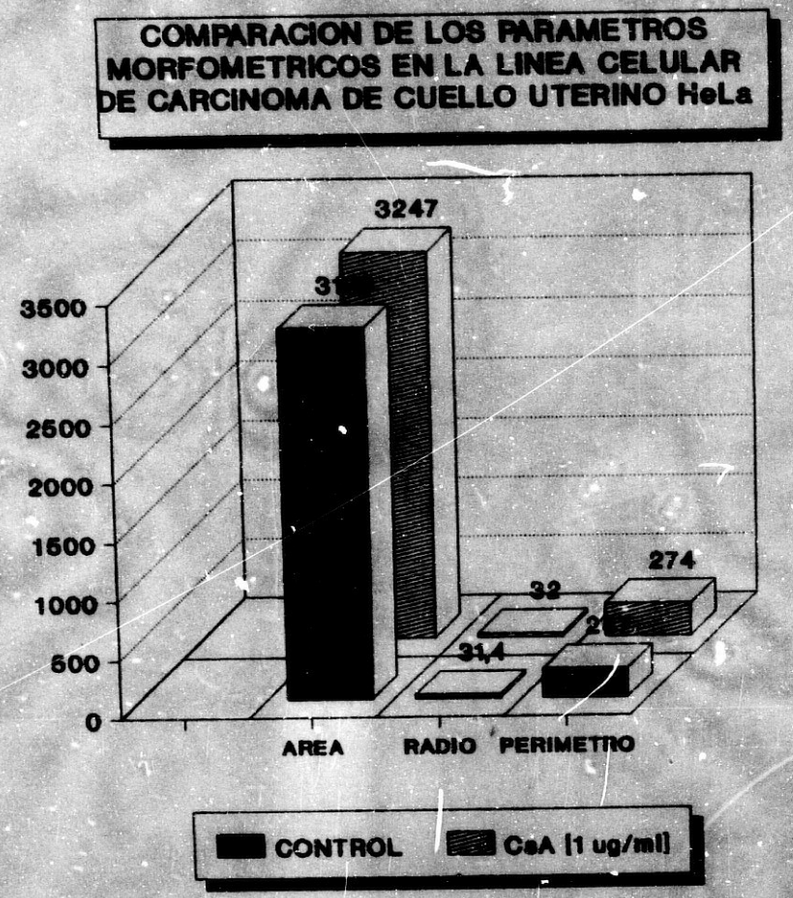
* Los valores corresponden a la media de 100 células.

** Nivel de significación para la t de Student.

Tabla 33. ESTUDIO DE LA TEXTURA GRANULAR EN LAS CELULAS MESENQUIMALES NORMALES RSO1

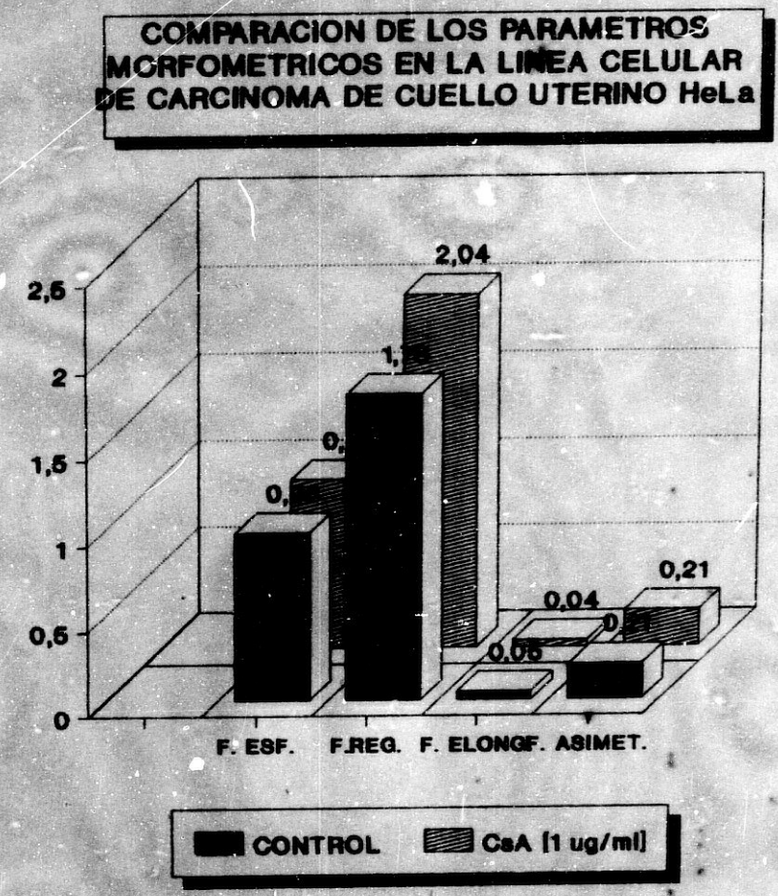
PARAMETROS ESTUDIADOS	CONTROL	CsA [1µg/ml]	NIV. SIG.
Nº DE GRANULOS		N.D.	
G. FINOS	41,8±21,07	"	-
G.GRUESOS	3,9±3,9	"	-
AREA GRANULAR		N.D.	
G. FINOS	162,3±87,7	"	-
G.GRUESOS	231,8±279,6	"	-
AREA TOTAL GRANULOS/AREA		N.D.	
G. FINOS	22,8±11,7	"	-
G. GRUESOS	2,1±1,9	"	-
Nº GRANULOS/CELULA		N.D.	
G. FINOS	8,7±4,7	"	-
G. GRUESOS	12,6±15,3	"	-
AREA MEDIA GRANULAR		N.D.	
G. FINOS	1,9±0,5	"	-
G.GRUESOS	21,7±24,4	"	-

* Los valores corresponden a la media de 100 células.



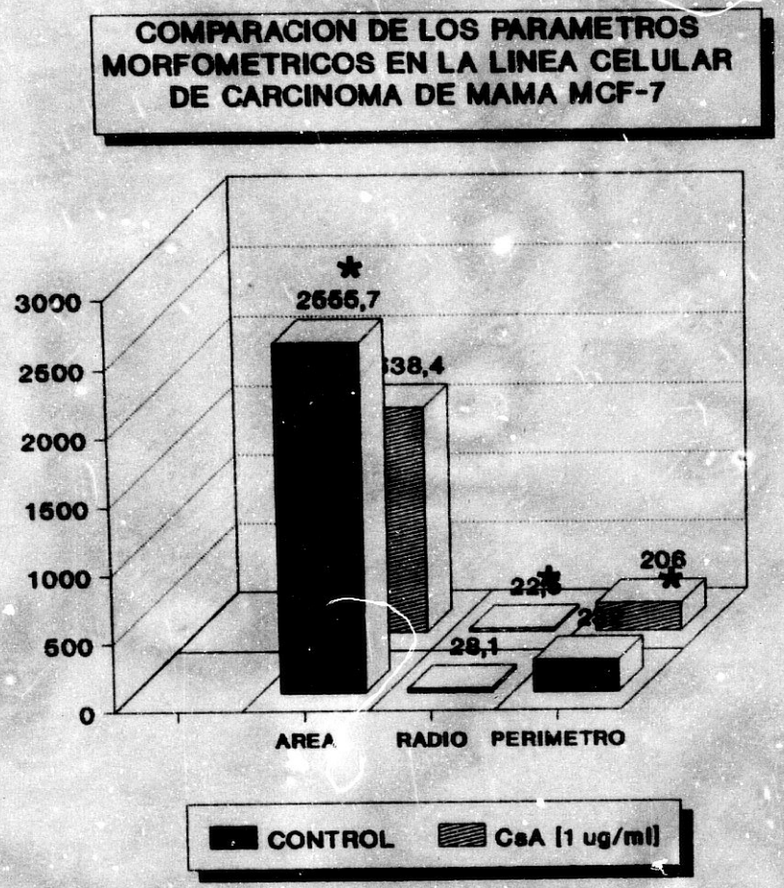
NO SIGNIFICATIVO, t de STUDENT

GRAFICA 17a



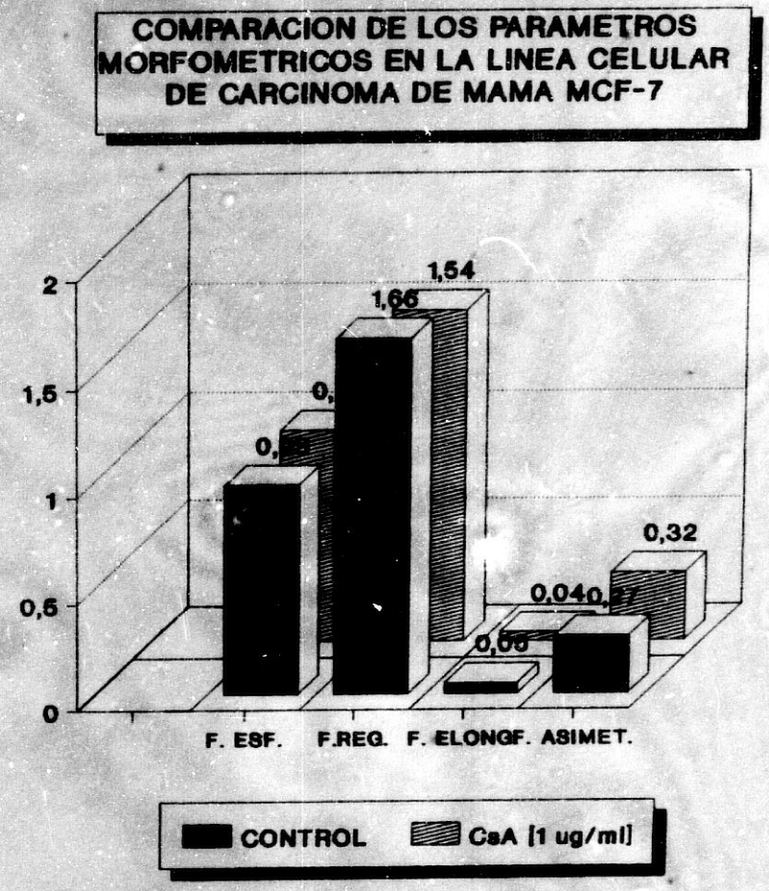
NO SIGNIFICATIVO, t de STUDENT

GRAFICA 17b



*p<0.001, t de STUDENT

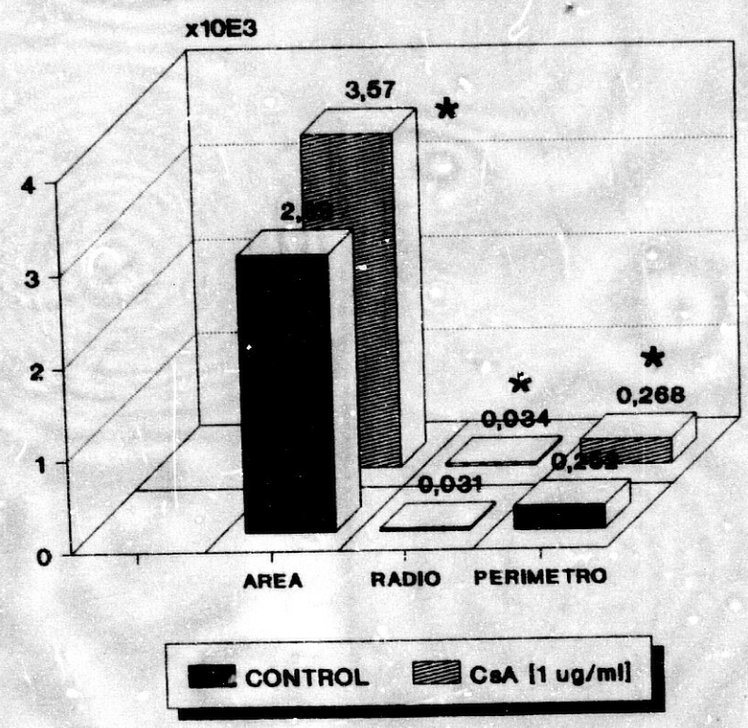
GRAFICA 18a



NO SIGNIFICATIVO, t de STUDENT

GRAFICA 18b

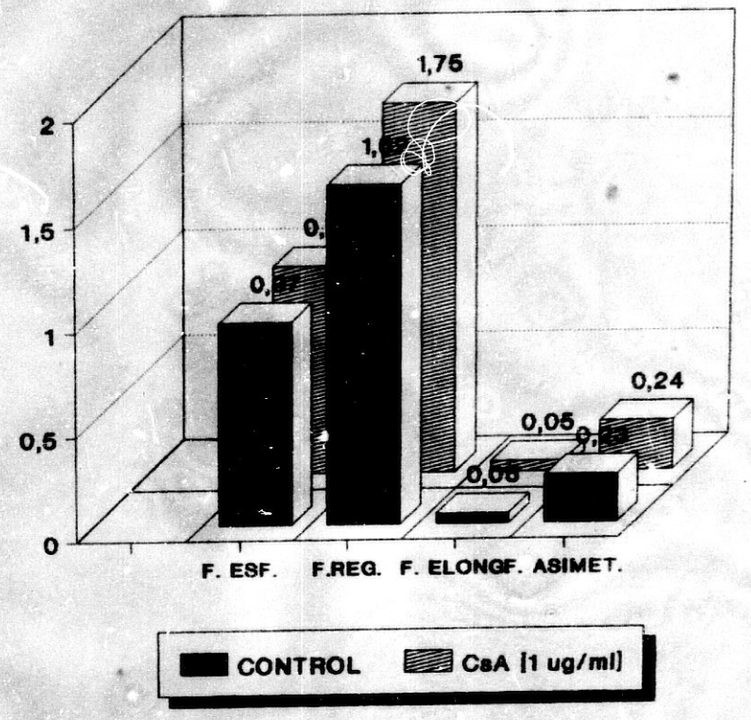
COMPARACION DE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS EN LA LINEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK Mel-5



* p<0.001, t de STUDENT

GRAFICA 19a

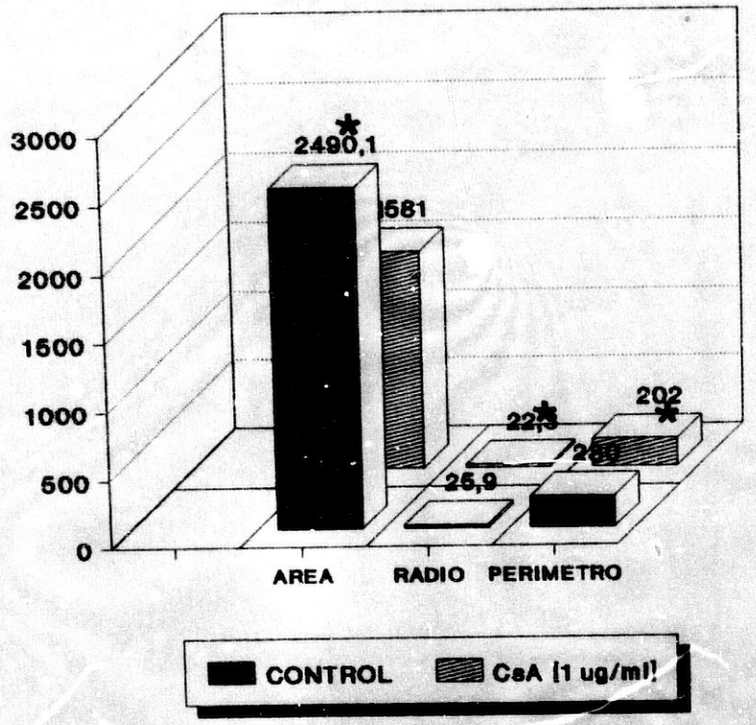
COMPARACION DE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS EN LA LINEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK Mel-5



NO SIGNIFICATIVO, t de STUDENT

GRAFICA 19b

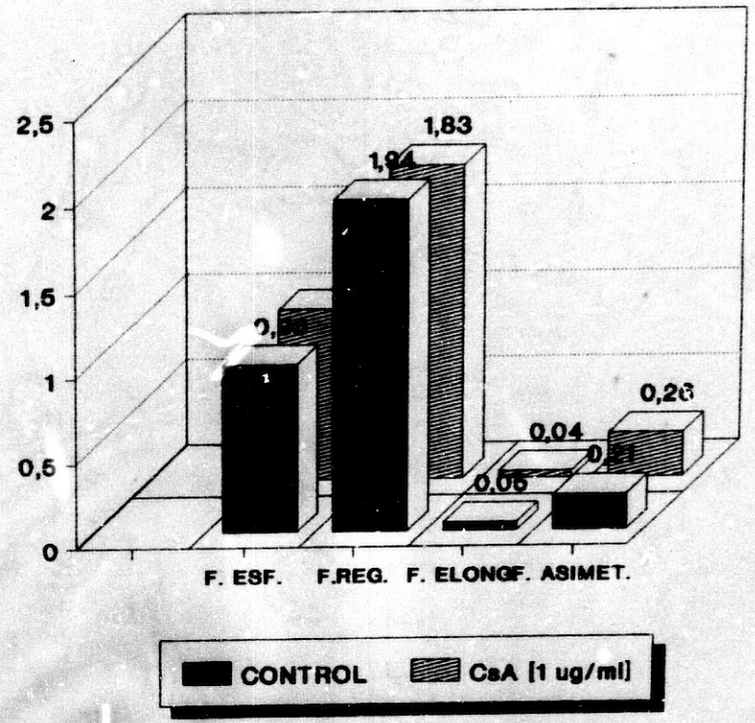
COMPARACION DE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS EN LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16.



*p<0.001, t de STUDENT

GRAFICA 20a

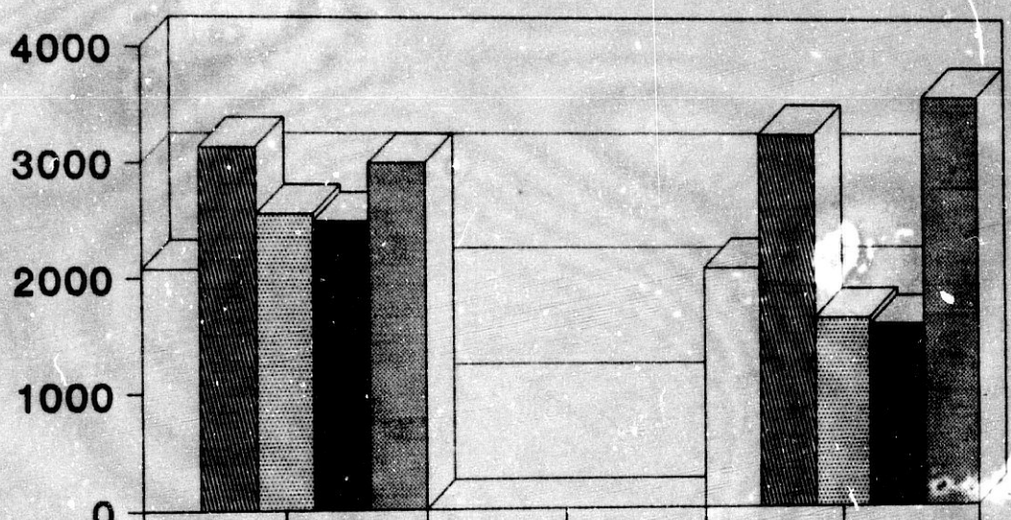
COMPARACION DE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS EN LA LINEA CELULAR DE MELANOMA MURINO B-16.



NO SIGNIFICATIVO, t de STUDENT

GRAFICA 20b

COMPARACION DEI AREA CELULAR MEDIA ENTRE CELULAS MESENQUIMALES NORMALES Y CELULAS TUMORALES.



RSO1	2072	2072
HeLa	3133 **	3247 *
MCF-7	2555	1638 **
B-16	2490	1581 **
SK mel-5	2998 *	3570 *

RSO1 HeLa MCF-7
B-16 SK mel-5

* p<0.01 ** p<0.001, t de STUDENT

GRAFICA 21

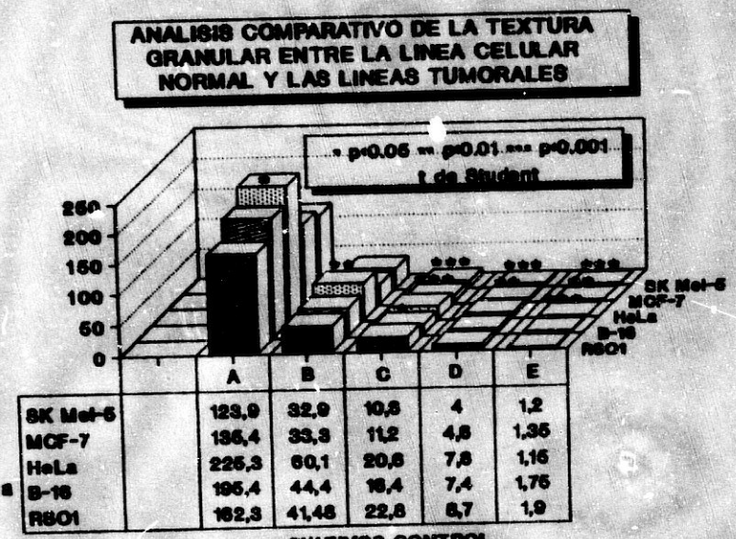
A= Area granular

B= Nº de gránulos

C= Area total gránulos/área

D=Nº granulos/célula

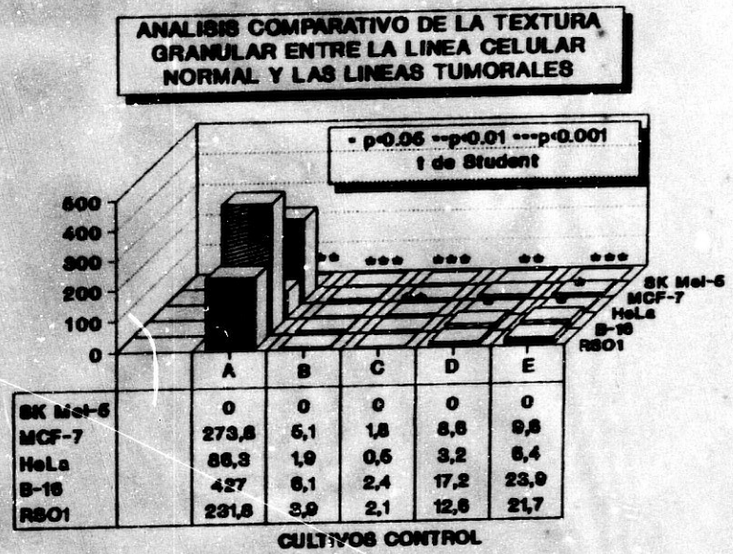
E= Area media granular



	A	B	C	D	E
SK Mel-5	123,9	32,9	10,5	4	1,2
MCF-7	136,4	33,3	11,2	4,8	1,35
HeLa	225,3	60,1	20,6	7,8	1,16
B-16	195,4	44,4	16,4	7,4	1,75
RSO1	162,3	41,48	22,8	8,7	1,9

CULTIVOS CONTROL

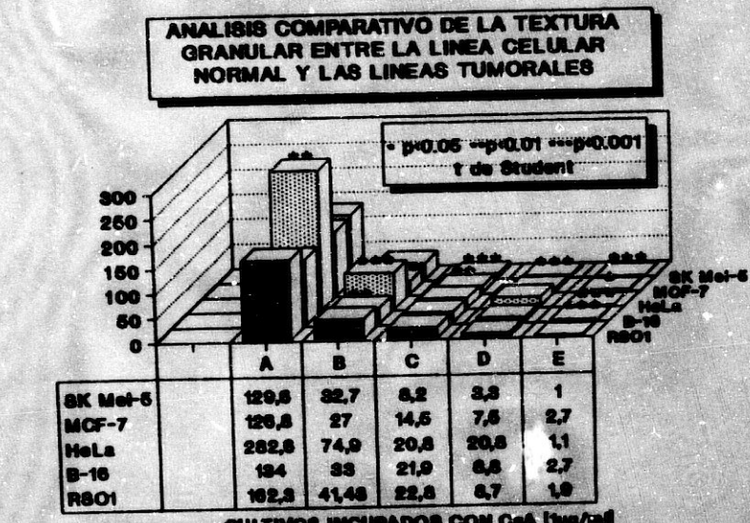
GRANULOMETRIA FINA



	A	B	C	D	E
SK Mel-5	0	0	0	0	0
MCF-7	273,8	5,1	1,8	8,8	9,8
HeLa	86,3	1,9	0,5	3,2	6,4
B-16	427	6,1	2,4	17,2	23,9
RSO1	231,8	3,9	2,1	12,6	21,7

CULTIVOS CONTROL

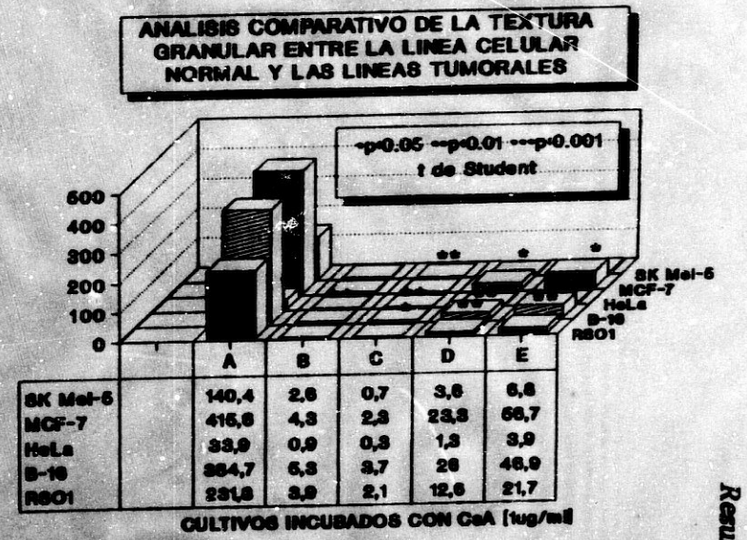
GRANULOMETRIA GRUESA



	A	B	C	D	E
SK Mel-5	129,6	32,7	8,2	3,3	1
MCF-7	126,8	27	14,5	7,5	2,7
HeLa	282,8	74,9	20,8	20,8	1,1
B-16	194	33	21,9	8,8	2,7
RSO1	162,3	41,48	22,8	8,7	1,9

CULTIVOS INCUBADOS CON CsA [ug/ml]

GRANULOMETRIA FINA



	A	B	C	D	E
SK Mel-5	140,4	2,6	0,7	3,6	6,6
MCF-7	415,6	4,3	2,3	23,3	66,7
HeLa	33,9	0,9	0,3	1,3	3,9
B-16	364,7	5,3	3,7	26	46,9
RSO1	231,8	3,9	2,1	12,6	21,7

CULTIVOS INCUBADOS CON CsA [ug/ml]

GRANULOMETRIA GRUESA

GRAFICA 22

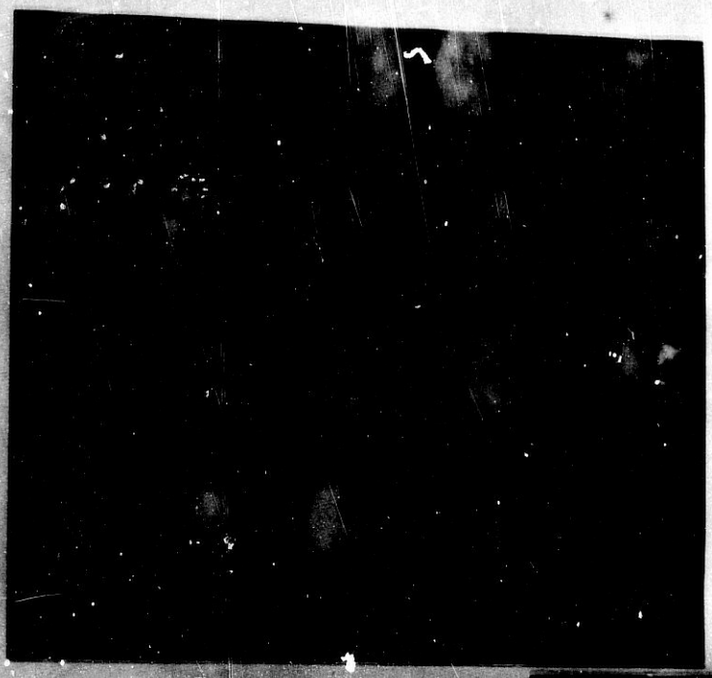


Ilustración 5. Ejemplo de 25 imágenes reales captadas, teñidas con hematoxilina, en la linea HeLa.

Ilustración 6. Transformación en densidad óptica integrada en la linea HeLa.

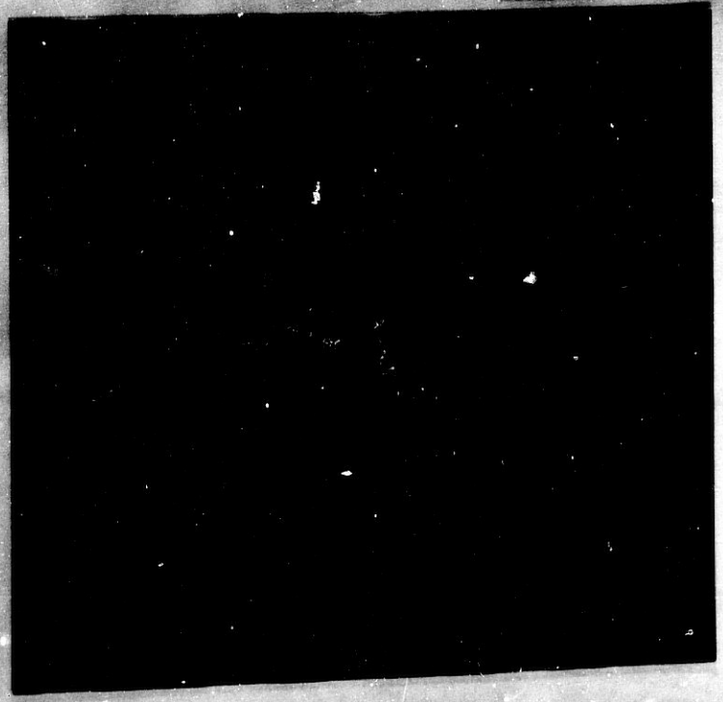


Ilustración 7. Ejemplos de máscara de segmentación del perfil nuclear.

Ilustración 5. Máscara de presentación de las líneas HeLa(a), MCF-7(b), SK Mel-5(c) y B-16(d).

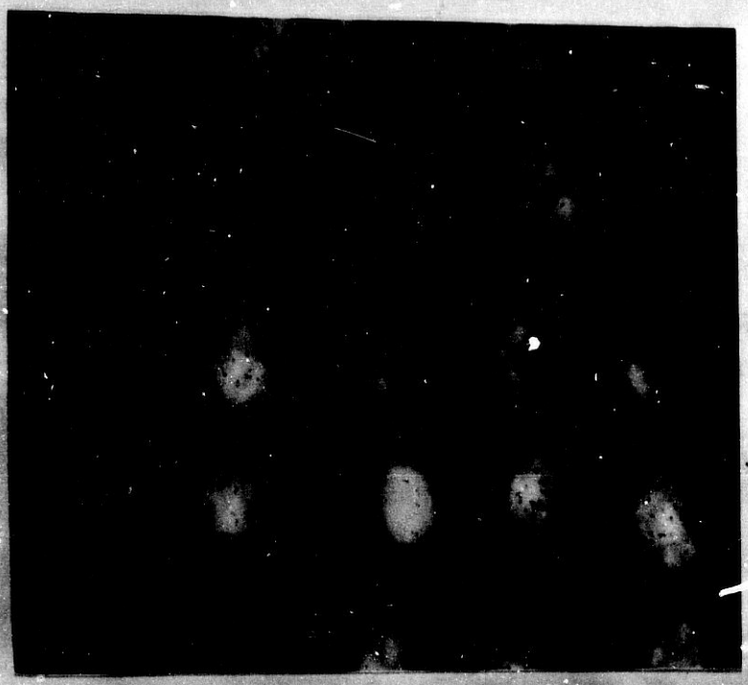


Ilustración 9. Textura granular fina de la línea MCF-7.

Ilustración 10. Textura granular gruesa de la línea MCF-7.

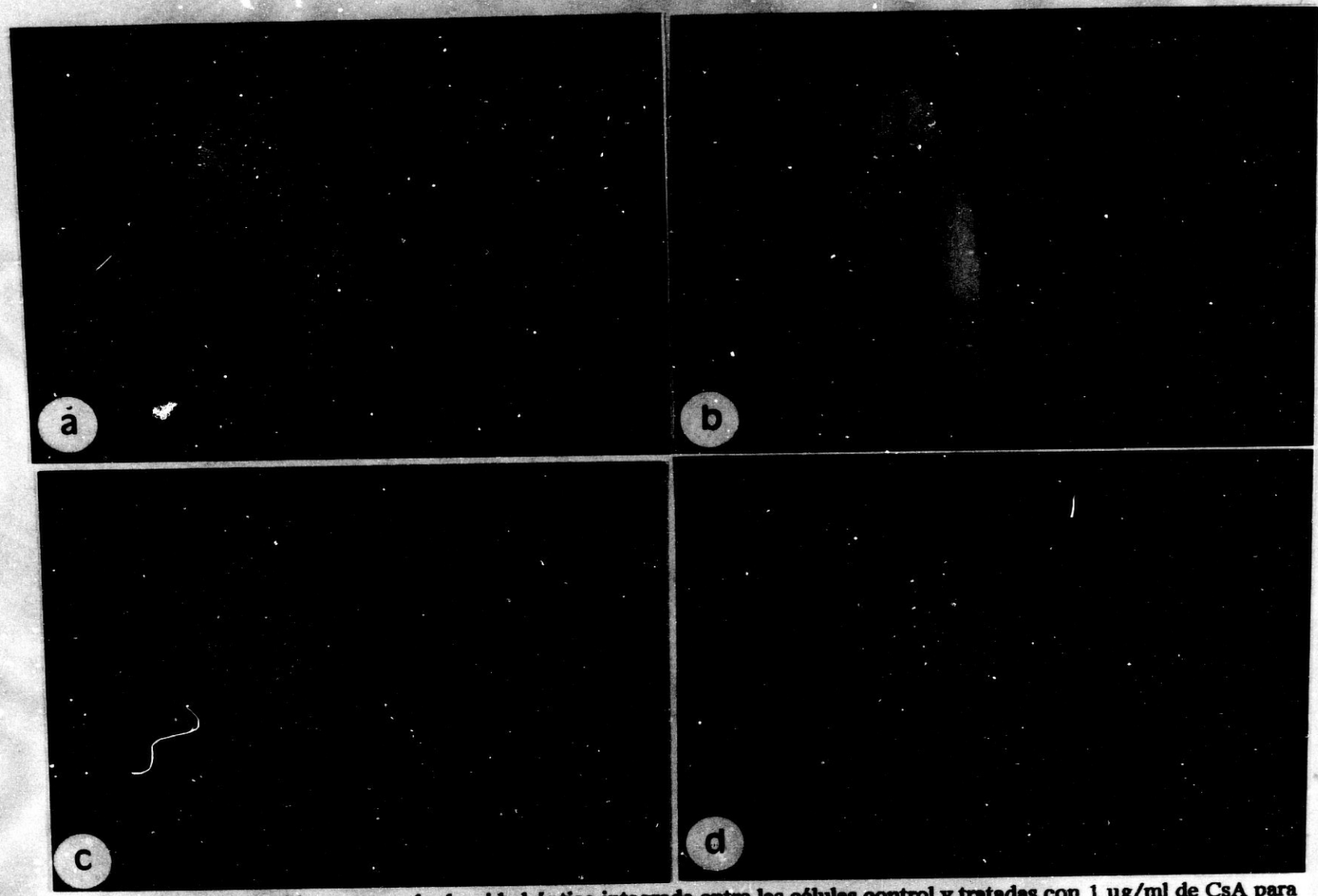


Ilustración 11. Comparación de los histogramas de densidad óptica integrada entre las células control y tratadas con 1 µg/ml de CsA para las líneas MCF-7 (a y c) y HeLa (b y d). Obsérvese como para MCF-7 el histograma control (a) se homogeniza en una gama más reducida de grises tras el tratamiento (c), como índice del aumento de heterocromatina y disminución del tamaño nuclear. Por el contrario en la línea HeLa, el histograma control se dispersa en una más amplia gama de grises tras el tratamiento con 1 µg/ml de CsA, indicativo de una mayor heterogeneidad cromatínica en este caso.

III-5.- DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CsA Y SUS METABOLITOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVOS.

Uno de los fines del trabajo presentado era conocer la concentración de CsA y sus metabolitos en los medios de cultivos de las líneas HeLa, MCF-7, SK Mel-5 y B-16 a los 7 días de ensayo, 6 días de tratamiento con CsA, con concentraciones de 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,01 µg/ml de CsA, añadidas una sola vez a lo largo de la experiencia. También queríamos conocer con exactitud las concentraciones reales de las disoluciones de CsA que nosotros preparamos y añadimos a los pocillos correspondientes así como, que ocurría con estas concentraciones de CsA añadidas a los medios de cultivo sin células, tras ser incubadas en estufa de CO_2 a 37ºC durante 6 días. Con esta finalidad hemos utilizado el método CYCLO-TRAC NS RIA, como se indica en el apartado II-7 de Material y Métodos, realizando numerosas mediciones en los medios de cultivos indicados anteriormente, obteniendo unos resultados discordantes puesto que no guardan ninguna correlación entre las concentraciones a medir en todas ellas.

DISCUSION

IV. DISCUSION GENERAL.

IV-1.- DISCUSION SOBRE LOS ENSAYOS DE QUIMIOSENSIBILIDAD IN VITRO.

Debido a que la finalidad de este trabajo fué establecer y valorar el efecto antiproliferativo "in vitro" sobre líneas de carcinoma y melanoma en cultivo de la CsA, un fármaco con escasa actividad citotóxica, los métodos de cuantificación celular convencionales para este último efecto, fueron poco útiles. Por ello se seleccionó el MTT como test mas sensible a las pequeñas modificaciones que cabría esperar por acción de dicha droga. Esta técnica cuantitativa se enmarca dentro del grupo de pruebas consistentes en la medición del daño inducido sobre las células en cultivo, mediante inhibición del metabolismo celular, en particular, la inhibición de la actividad deshidrogenasa, ya que el dimetiltiazol-difeniltetrazolium, MTT, es fácilmente reducido por algunos coenzimas tales como NADH y NADPH y por otros sustratos reductores entre los que se incluyen diversas deshidrogenasas, originando un derivado coloreado, MTT formazán, que puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Vistica et al, 1991).

Con respecto a la evaluación de la quimiosensibilidad en cultivo mediante las sales de tetrazolio, se plantean una serie de puntos relevantes. 1º.- Las líneas celulares derivadas de una amplia selección de tumores sólidos humanos por una variedad de técnicas de aislamiento pueden ser cultivadas y ensayadas observando la composición de medios de cultivo celulares; 2º.- La mayoría de las líneas celulares exhiben perfiles colorimétricos aceptables (absorbancias control > 0.500 unidades), que resultan de la reducción de las sales de tetrazolio mediada por las células; 3º.- Las mediciones del crecimiento celular por las sales de tetrazolio tienen una buena correlación con los resultados obtenidos por métodos bioquímicos, como es la cuantificación de proteínas totales mediante la técnica colorimétrica de sulfo-rodamina B(SRB) (Rubinstein et al, 1990), con métodos radiactivos, como son la incorporación de timidina tritiada (Mosmann, 1983) y de Cr51 (Heo et al, 1990), con sencillas medidas de la viabilidad celular, como es la exclusión Tripan-blue 0.1% (P/V) y con ensayos clonogénicos bajo diferentes condiciones (Alley et al, 1988) y 4º.- En condiciones de cultivo específicas y apropiados parámetros de ensayo, se observa que el ensayo con MTT proporciona índices reproductibles de sensibilidad a drogas para líneas celulares individuales por un tiempo de 10-12 meses, incluyendo células criopreservadas y recultivadas de un amplio listado de líneas celulares tumorales humanas (Alley et al, 1988).

En el caso de nuestro estudio, sobre el método del MTT utilizado originariamente por Mosmann (1983), se han introducido diversas modificaciones entre las que destacan, un nuevo sistema disolvente, así como un incremento en la duración del cultivo y en el tiempo de incubación con MTT, lo cual ha resultado en una metodología de ensayo que proporciona

mejores índices de sensibilidad y reproductibilidad de crecimiento, así como de sensibilidad a la droga para una gran selección de tumores humanos y líneas fibroblásticas. A este respecto puede concluirse que las modificaciones realizadas mejoran y alivian la ejecución del ensayo.

Además de las innovaciones comentadas, el protocolo usado por nosotros incluye la utilización de un medio de cultivo (MEM, 5% SBFI) adecuado para el crecimiento de las líneas celulares ensayadas, con un porcentaje de SBFI que aporta un mínimo de nutrientes. La limitación en el empleo de SBFI evita la estimulación proliferativa de las células en cultivo. La técnica de incorporación de la droga al cultivo en dosis única comenzando 24 horas después de la inoculación celular a baja densidad y manteniéndola de forma "continua" hasta finalizar el ensayo, cuya duración se fijó en 7 días, se basó en varias razones: 1ª) Muchas líneas celulares requieren un período de tiempo para alcanzar el crecimiento óptimo y generar niveles de formazán indicados para los ensayos de drogas. 2ª) La exposición continua de la droga asegura que los agentes con mínima actividad inhibitoria del crecimiento debida a su limitada solubilidad en medio de cultivo y/ó a que requieren un contacto prolongado con las células, no sean excluidos prematuramente de subsiguientes ensayos. 3º) Debido a que los ensayos a corto plazo no proporcionan tiempo suficiente para detectar la "muerte diferida", que se ha demostrado que ocurre después del tratamiento con algunos agentes quimioterápicos, un ensayo de 7 días podría ser más idóneo para encontrar tales efectos que un ensayo de menor duración (Alley et al, 1988) (Boyd, 1989).

Entre los inconvenientes del MTT destacan : 1º) El DMSO como otros disolventes orgánicos debe ser mezclado y manejado cuidadosamente así como, almacenado y deshechado bajo condiciones adecuadas para evitar riesgos; 2º) Las sales de tetrazolio pueden ser reducidas a formazan directamente por un número de componentes estándar y experimentales. Este hecho se une a que muchos agentes muestran absorción en la región de la luz visible, lo cual requiere que cada placa del microensayo contenga sus correspondientes pocillos blanco (medio sin células), para determinar la extensión en la que estos agentes contribuyen a la absorción de la prueba; 3º) Los puntos extremos de absorción del microensayo con MTT parecen estar influenciados en distinto grado por diversos factores medioambientales experimentales y parámetros de cultivo (Alley et al, 1988).

Respecto a la valoración de los resultados que proporciona el ensayo MTT, existen observaciones de que la reducción del MTT a su producto coloreado, MTT formazán, oscila significativamente entre líneas celulares tanto por la cinética de su formación como por el grado de saturación exhibida, y la edad del cultivo (Vistica et al, 1991). Nosotros hemos comprobado en las líneas celulares ensayadas que los valores de absorbancia para un mismo número de células

son diferentes en cada una de las líneas, siendo las líneas melánicas B-16 y SK Mel-5 las que presentan mayores valores, sobre todo esta última. Este resultado podría ser debido a que la melanina intervenga en la reducción del MTT a su producto coloreado (véase posteriormente).

Entre los factores medioambientales que afectan a la producción de MTT fórmazán, se encuentra la concentración de D-glucosa presente en el medio de cultivo para un tiempo de ensayo determinado. Una interpretación mas estricta indica que para una óptima reducción del MTT, se requiere un transporte y un metabolismo intracelular constante de la D-glucosa (Vistica, 1991). Sobre la influencia del pH, se cree que es variable y dependerá de diversos factores que constituyen las condiciones de cultivo (37ºC, 5%CO2, tampones, $NaHCO_3$, etc), llegando incluso a acentuar su acción (Vistica et al, 1991). Ambos factores, aunque importantes para la valoración absoluta de un ensayo MTT, no han sido evaluados y son de menor importancia en este trabajo donde los resultados del efecto de la CsA se obtienen principalmente de la comparación con los controles, sometidos a idéntico protocolo.

Otro parámetro que influye en la cuantificación de citotoxicidad es el tiempo de exposición al MTT. Estas y varias consideraciones adicionales estudiadas recientemente, han resultado en la adopción por el NCI de un ensayo "end-point" basado en marcadores de proteínas como SRB, para reemplazar al MTT y XTT (sales de tetrazolio de 2ª generación). Este ensayo incluye la eliminación de aquellos pasos "tiempo-dependientes", tales como el tiempo de exposición al tetrazolio, pues proporciona un "end-point" fijo que no depende del tiempo y para el MTT la necesidad de extraer el formazán con un disolvente orgánico (DMSO) (Vistica, 1991).

El formazán del XTT, en contraste al formazán MTT, es soluble en agua y así puede ser cuantificado en el medio de cultivo sin la necesidad de extracción con disolventes orgánicos. Sin embargo, el XTT presenta varios problemas singulares que incluyen la incapacidad de muchas líneas celulares para metabolizar este tipo de sales de tetrazolio, lo que requiere la adición de un reactivo que transfiera electrones, el metilsulfato de fenazina (PMS), que es un promotor adecuado para la reducción celular del tetrazolio. Parece que la adición de este reactivo limita la penetración celular de las sales de tetrazolio. Además, la alcalinización del medio de cultivo, que ocurre durante la manipulación de las placas de ensayo, resulta en la formación ocasional de material cristalino en el ensayo con XTT, que causa mediciones de densidad óptica erráticas. La formación de cristales ocurre en un rango de pH entre 7 y 9, y puede atribuirse a la reacción del PMS (E=+0.08V) con el glutation celular (E'=-0.24V) (Boyd, 1989) (Vistica et al, 1991).

Hay motivos biológicos que podrían afectar a la elección entre ensayos con el MTT y la SRB. Los ensayos con tetrazolio tienen en cuenta la capacidad de las células viables de reducir

el tetrazolio a formazán. Estos ensayos tienen un desarrollo muy simple, que se basa en que las células muertas o sus productos no reducen el tetrazolio. Los problemas potenciales que se derivan de los ensayos con tetrazolio ya han sido mencionados y pueden ser agrupados en: a) Reducción química del tetrazolio por los agentes quimioterápicos probados, los cuales dan lugar a niveles falsos de formazán; b) Interferencia química con la reducción celular del tetrazolio; y c) Una variedad de condiciones metabólicas (p.e., deplección de glucosa y variaciones en el pH), lo cual podría alterar la producción de formazán que proviene del tetrazolio. Probablemente la gran absorbancia observada en la línea **SK Mel-5** sea debida a un efecto de interferencia en la reducción de MTT ocasionada por la melanina. Usando el ensayo con la SRB para determinar el crecimiento celular o la viabilidad, se asume que las células muertas o lisadas, son eliminadas durante el procedimiento, para que no contribuyan al "end-point" colorimétrico. Por lo tanto, una preocupación posible es que este ensayo podría sobreestimar la fracción superviviente de las células a causa de la presencia de células muertas por la acción de la droga, pero no lisadas (Rubinstein et al, 1990). Un análisis pormenorizado indica que, al menos con respecto al parámetro IC50, los ensayos con el MTT y la SRB generalmente producen resultados similares en el screening piloto. Sin embargo, el ensayo con la SRB tiene una marcada tendencia a medir significativamente menos inhibición de crecimiento (IC) que el ensayo con MTT, para un pequeño subgrupo (12%) de los casos en los que, ó el ensayo MTT ó el ensayo SRB indican muy altos niveles de inhibición de crecimiento (>90%) para una línea celular particular con un cierto componente (Monks et al, 1991). Hay un subconjunto de agentes quimioterápicos y líneas celulares que son particularmente propensos a exhibir este tipo de discrepancia. Para este subconjunto, el ensayo SRB mide significativamente menos IC (diferencias en las razones tratadas control >20%). Este fenómeno podía ser un artefacto del ensayo SRB relacionado con la presencia de proteínas de las células muertas, indistinguibles de las asociadas a las células supervivientes (Monks et al, 1991).

De manera alternativa y como ya se ha mencionado, el ensayo MTT puede producir artefactualmente bajos niveles de formazán debido a la deplección de glucosa ó a interferencias en los procesos de reducción celular con los agentes probados. Pese a ello, esta discrepancia tiene efectos mínimos en el cálculo de los valores de IC50, debido a que se restringe a la porción de la curva dosis-respuesta por debajo del 10%. Si en el análisis de los datos del screening se destaca el uso de valores de IC50 como en nuestro ensayo, la determinación de la citotoxicidad diferencial no se afecta significativamente. Por el contrario, si en lugar de este índice se usan exclusivamente otras mediciones relativas a altos niveles de muerte celular, tales como los valores de IC90, de nuevo hay que prestar atención a las potenciales discrepancias entre los resultados obtenidos con los dos ensayos (Rubinstein et al, 1990). Por ello, el ensayo SRB muy indicado en los test de citotoxicidad inducida por drogas quimioterápicas (Skehan, 1990), hubiese sido de

menor valor que el ensayo del MTT en nuestra experiencia.

Pese a todo lo expuesto, el ensayo con SRB es mas simple, rápido y sensible que el ensayo con MTT, asimismo proporciona una mejor linealidad con el número de células, permite el uso de concentraciones saturadas del colorante, es menos sensible a fluctuaciones ambientales y es independiente del metabolismo intermediario. Sin embargo, para un screening a gran escala, el procedimiento es mas laborioso (p.e., requiere múltiples pasos de lavado) (Boyd, 1989), por lo tanto, para el manejo de pequeñas muestras no es tan práctico como el ensayo con MTT. Otra razón por la que nosotros hemos optado por este último, es que está incorporado al laboratorio de Oncología básica del Departamento de Radiología y Medicina Física, lo cual permite tener un buen flujo de resultados y de comparación con otros grupos de investigación de la zona que realizan estudios equivalentes.

De todo lo anterior podemos concluir que la reducción del MTT se modifica por factores metabólicos y de otra índole, que pueden afectar sustancialmente la cuantificación de la viabilidad celular. Por ello nos pareció prudente establecer unas condiciones de ensayo que minimizaran estos efectos. Entre estas se incluyeron la utilización de densidades celulares de inoculación inicial y un tiempo de ensayo que no resultara en la deplección de nutrientes del medio, así como, el establecimiento de concentraciones óptimas y tiempos de exposición para el MTT al igual que preconizan Vistica y colaboradores (1991). En este sentido, nosotros hemos trabajado con unas condiciones estándar para las 4 líneas celulares, tales como la inoculación de 2.500 células por pocillo, el mismo medio de cultivo (MEM, 5% SBFI v/v) y la misma concentración de MTT por pocillo (8,3 mg/ml) para todas las líneas ensayadas, debido a que queríamos estudiar el efecto de la CsA sobre líneas de melanoma humano y murino así como, sobre distintas líneas epiteliales, de manera que fuese posible establecer una comparación global entre todas. Por otra parte, otra razón a tener en cuenta para definir un mismo ensayo, es la complejidad del método si para cada una de las líneas se hubiesen establecido unas condiciones particulares. No obstante, para ajustar en lo posible el método se han realizado múltiples ensayos preliminares, modificando la densidad de inoculación celular barajando un rango de 1.000 a 5.000 células por pocillo, así como la cantidad de SBFI a añadir al medio de cultivo y la concentración de MTT por pocillo, antes de establecer cuales eran las condiciones mas favorables para el estudio del conjunto de las líneas ensayadas.

En lo que se refiere a la concentración empleada de MTT por pocillo, hay que hacer la salvedad de que la mayor parte de los ensayos estándar de MTT, están diseñados para la testificación de múltiples moléculas con posible acción antiproliferativa y farmacológica sobre distintas líneas celulares, con la finalidad de hacer un screening inicial de las que serán sometidas

a estudios mas profundos, tal y como se realiza rutinariamente en el NCI de USA (Alley et al, 1988). En este tipo de estudios, la concentración de MTT para la demostración de efectos notables no es un punto crucial, de forma que la mayor parte de los test estándar incluyen concentraciones de MTT excesivamente bajas, generalmente 0,3 µg/ml por pocillo. En nuestro ensayo, las modificaciones técnicas realizadas nos han llevado a establecer una concentración de MTT lo mas idónea posible para el global de las líneas testificadas, debido a que no pretendemos demostrar un efecto citotóxico directo de la CsA a baja concentración, por otra parte inexistente y no descrito en la literatura, sino que se pretende demostrar los efectos posibles del fármaco a concentraciones dentro del rango a las utilizadas fisiológicamente. Por este motivo es conveniente trabajar con concentraciones altas de MTT, con la idea de que las células produzcan una reducción lo más completa posible y que las pequeñas modificaciones originadas por el fármaco, puedan ser detectadas por la lectura espectrofotométrica. No obstante y por las razones que más adelante se expondrán, en el caso particular de la línea **SK Mel-5** no hemos conseguido poner de manifiesto su poder reductor al 100%.

IV-2.- DISCUSION SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES ENSAYADAS EN CULTIVO Y EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA CsA.

La cinética de crecimiento de las líneas celulares **HeLa, MCF-7, SK Mel-5 y B-16** presenta diferencias utilizando para todas ellas las mismas condiciones de cultivo. Entre ellas, la línea **B-16** ha demostrado una gran capacidad proliferativa tal y como se ha demostrado en trabajos previos (Fidler, 1962). Las líneas de carcinoma **HeLa y MCF-7** presentan un crecimiento similar entre si e inferior a la línea **B-16**, realizando prácticamente el mismo número de duplicaciones a lo largo de 7 días, tiempo en el que hemos realizado la mayoría de nuestras experiencias. La línea **SK Mel-5** presentó menor capacidad proliferativa no llegando a concluir una segunda duplicación a los 7 días, de forma que tardó el doble de tiempo que la otra línea de melanoma en alcanzar la fase de meseta y una semana más que las líneas de carcinoma. Todo esto sugiere que para los estudios individuales a realizar sobre esta línea, sería conveniente partir de una densidad celular mayor a la de 2.500 células empleada en nuestro ensayo.

El estudio comparativo de las curvas patrón para las diferentes líneas ensayadas, nos ha permitido traducir los valores de absorbancias a número de células y conocer como metabolizan la sal de tetrazolio, MTT, cada una de las líneas. Así, para un mismo número de células, las líneas presentaron distintos valores de absorbancias, es decir, reducen de manera diferente el MTT, siendo la línea celular **SK Mel-5** en la que los datos de este parámetro son mayores,

seguida de la línea B-16, HeLa y en último lugar MCF-7. Esta distribución de las curvas patrón es concordante con la actividad proliferativa (de mayor a menor) del panel ensayado de líneas celulares, al igual que se ha observado en estudios semejantes (Alley et al, 1988), a excepción de lo observado para la línea SK Mel-5, que es la que presenta mayores valores de absorbancias y menor tasa proliferativa. Como se ha comentado anteriormente, el hecho de que las líneas melánicas originen mayores valores de absorbancias, nos hizo pensar que la melanina interviene en el proceso de reducción del MTT, de aquí que la línea celular SK Mel-5 que contiene más pigmento melánico (Carey et al, 1976) que la línea B-16 (Fidler, 1962) origine mayor cantidad del producto coloreado MTT formazán. A pesar de estas diferencias, la comparación entre los valores medios de absorbancias para un mismo número de células de cada una de las líneas ensayadas respecto a las demás, no fué estadísticamente significativa salvo en el caso de las líneas MCF-7 y SK Mel-5 cuando el número de células es bajo y perdiéndose esta significación para valores altos de número de células. Esto puede ser debido a que la línea SK Mel-5 necesite mayor concentración de dimetiltiazol-difeniltetrazolio por pocillo a la incorporada para que las células manifiesten su poder reductor al 100%, de aquí que se aprecien diferencias significativas para un número reducido de células y no cuando son muchas las células capaces de reducir este reactivo (Vistica et al, 1991). Pese a todo lo expuesto para la mayoría de las líneas celulares, es imprescindible traducir los valores de absorbancias a número de células mediante la utilización de la curva patrón correspondiente a cada una de las líneas.

Respecto a la demostración de un efecto antiproliferativo por parte de la CsA frente a las líneas celulares ensayadas de carcinoma y melanoma, sólo se ha observado claramente a dosis que superan los niveles terapéuticos (5 µg/ml ó mayores), añadida esta dosis sólo el primer día de tratamiento. Acerca de este tema, en la literatura hemos encontrado estudios sobre distintas líneas celulares en cultivo tratadas con concentraciones de CsA que abarcan un rango muy amplio, desde 0,01 hasta 10 µg/ml ó más, obteniéndose resultados diversos según las líneas celulares ensayadas y las condiciones de ensayo, coincidiendo muchos de ellos con los obtenidos en esta experiencia. Así, en la línea de carcinosarcoma mamario EMTG/Ca/VJAC de ratón y la línea celular $CH^{R}C^{5}$ de hamster chino MDR+, la inhibición del crecimiento con CsA se produjo a 5 µg/ml, no encontrándose efectos sobre la proliferación de las células a 2,5 µg/ml de CsA (Twentyman et al, 1990). Otro trabajo realizado sobre la línea de ovario de hamster chino corrobora al anterior, ya que no obtuvieron efecto antiproliferativo con CsA a concentraciones de 1-2 µg/ml (Chambers et al, 1989). Por el contrario, en la línea celular de leucemia linfoblástica aguda T-L100 MDR+, bajas concentraciones de CsA produjeron una muerte celular significativa (Larsson & Nygren, 1990). El mismo efecto se observó en la línea celular parental LO de la anterior, ya que bajas dosis de CsA fueron inhibitorias del crecimiento, mientras que concentraciones mas altas (>10 µg/ml) fueron progresivamente citotóxicas (Larsson & Nygren,

1990). En este sentido debe destacarse que los mayores efectos descritos de la CsA ocurren en líneas de neoplasias linfoides y hematopoyéticas no ensayadas por nosotros. En contraste con los efectos antiproliferativos de la CsA a dosis no inferiores a 2 µg/ml sobre líneas neoplásicas, se han descrito efectos a dosis terapéuticas (0,1 µg/ml) sobre líneas no tumorales de QCs humanos (Ramirez-Bosca et al, 1990b). En nuestro caso no disponemos de datos que puedan corroborar este hecho.

En nuestras condiciones de ensayo, la línea donde se aprecia mayor efecto de la CsA entre las estudiadas es la **SK Mel-5**, con un porcentaje de supervivencia a concentración de 5 µg/ml del 22%, siendo la IC50 la mas baja en el conjunto de las líneas ensayadas. En las líneas de carcinoma, el efecto de la CsA es similar, algo mas acentuado en la línea **HeLa** a concentración de 5 µg/ml, siendo la línea de melanoma murino **B-16**, la que muestra menor efecto a la acción de la droga, probablemente debido a su mayor capacidad de proliferación. En este sentido, la CsA no es un fármaco antineoplásico en sentido estricto, sino que probablemente interrumpe la trasmisión de mensajes entre núcleo y citoplasma (Citterio & Kahan, 1989) (Kahan, 1989b) y al no tener efecto antimitótico directo, el número de células que comparten por una misma dosis de CsA es mucho mayor para la línea **B-16** que para el resto.

A otras concentraciones de CsA distintas a 5 µg/ml, no se obtuvo significación estadística en las células ensayadas salvo en la línea celular **MCF-7** a 0,5 µg/ml de CsA. Sin embargo, si observamos los porcentajes de supervivencia en las otras tres líneas, a esta concentración también los valores son siempre menores a los obtenidos en pocillos tratados con 1 µg/ml de CsA, es decir, se produce mayor inhibición del crecimiento en todas las líneas a dosis de 0,5 µg/ml. Para explicar este efecto no puede argüirse un fallo técnico en el procesamiento del material, porque se ha controlado la concentración de CsA en múltiples ocasiones y además el hecho se repite en todas las experiencias y para las distintas líneas celulares ensayadas, aunque se acentuó más en la línea **MCF-7**. A este respecto, no existe una explicación clara para los efectos inhibitorios que producen ciertos fármacos a bajas dosis, mientras que ese efecto a dosis algo mayores no se produce.

En relación con los posibles efectos antiproliferativos de las sustancias donde se vehicula el fármaco, como es el caso del etanol, disolvente utilizado en la preparación de CsA a partir de la sustancia base, no origina modificaciones en los cultivos de las líneas estudiadas a la concentración mayor (10^{-5} mM) en la que se encuentra en las disoluciones de CsA incorporada a los pocillos. Esto coincide con los datos encontrados en la literatura referentes a que concentraciones de 50 mM de etanol ó menores a ésta, no tienen efecto citotóxico alguno sobre la línea de glioma de rata C-6 y el patrón de crecimiento fué similar a los controles (Alvaro,

1989).

Al ser comparados los resultados obtenidos en los ensayos de dosis-respuesta mediante CsA sustancia base, con los conseguidos cuando se utilizó ciclosporina comercial (DCL) (Sandimmun^{R}, SANDOZ), no se apreciaron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones ensayadas. Esto sugiere que el Cremophor, a las concentraciones que se encuentra en las disoluciones de CsA (10^{-2}%) preparadas por nosotros a partir de la solución inyectable vía venosa Sandimmun, no tiene ningún efecto atribuible "per se" sobre nuestras líneas celulares. No obstante, la literatura hace referencia a que el aceite de ricino polioxietilado altera la morfología de la línea epitelial renal de cerdo LLC-PK$_1$ cuando se utiliza a bajas concentraciones (10^{-2}-10^{-1}%), produciendo alteraciones similares a las observadas a bajas dosis de CsA en algunas células y observándose efecto citotóxico a mayores concentraciones (Nässberger et al, 1991).

En resumen, a pesar de que es evidente que la CsA tiene un efecto antiproliferativo sobre células epiteliales y de otra estirpe (Kanitakis & Thivolet, 1990) (Ramirez-Bosca et al, 1990b), muchas cuestiones han de ser resueltas antes de que el puzzle de los mecanismos de acción de la CsA pueda completarse. Esta tarea está dificultada también por las siguientes razones: 1) Los resultados obtenidos de estudios in vitro no son siempre extrapolables a lo que sucede in vivo; al menos una razón para esto es la posibilidad de que metabolitos generados en el hígado pueden exhibir propiedades sutilmente diferentes de las de la molécula nativa (Klaus & Chisholm, 1986); 2) La acción de la CsA puede ser pleitrópica, afectando algunos sistemas enzimáticos intracelulares, dependiendo de la concentración de la droga (Borel, 1988). Por ejemplo, mientras que dosis inmunosupresoras de CsA inhiben la actividad ODC estimulada por la prolactina, concentraciones subinmunosupresoras potencian la capacidad de la prolactina para inducir actividad de ODC (Russel et al, 1984); 3) Distintos tipos de células diana parecen responder a la CsA de manera diferente. Este es el caso de QCs epidérmicos versus de folículo piloso, donde la CsA evoca efectos opuestos. 4) Finalmente, pero no menos importante, la falta de conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan a la activación y proliferación celular es ciertamente un obstáculo para la elucidación de los mecanismos de acción de la CsA.

Un punto importante a enfatizar es el hecho de que el efecto de la CsA sobre células epiteliales a dosis farmacológicas es citostático mas que citotóxico, puesto que no parece resultar en destrucción permanente de las células madre sensitivas. Además, en todos los ensayos in vitro estudiados de células cultivadas, la actividad antiproliferativa de la CsA se ha probado que revierte con bastante rapidez (Kanitakis & Thivolet, 1990).

IV-3.- DISCUSION SOBRE LA VALORACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA DE GP-170 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.

Aunque no existan referencias bibliográficas de la expresión de GP-170 en las líneas celulares testificadas a excepción de MCF-7 (Gervasoni et al, 1990) (Volm et al, 1991), las experiencias realizadas mediante inmunohistoquímica con anterioridad en nuestro laboratorio, indican que se trata de líneas en las cuales no se ha inducido MDR, por lo que la expresión de esta glicoproteina de membrana aunque presente, es baja. Debido a ello, se decidió valorar la expresión de esta glicoproteina mediante citometría de flujo, por ser ésta una técnica de mayor sensibilidad y capaz de detectar pequeños acúmulos de moléculas (Braylan et al, 1982) (Coon & Weinstein, 1991), que la inmunohistoquímica convencional. Con esta finalidad se realizaron técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta para los anticuerpos monoclonales C-219 y JSB-1. Respecto al primero no se obtuvieron diferencias con los controles negativos mediante el kit específico de C-219 para citometría de flujo. Aunque en la literatura existen algunos trabajos donde emplean este anticuerpo para testificar los niveles de GP-170 mediante citometría de flujo (Kartner et al, 1985), en nuestra experiencia este AcMo es escasamente sensible, tanto en citometría de flujo como para las técnicas inmunohistoquímicas. La aparente contradicción entre la negatividad en nuestro estudio y positividad de lo encontrado en la literatura, probablemente es debida al hecho de que la testificación de trabajos previos se ha realizado sobre líneas en las que se ha inducido fenómenos de MDR a drogas (Kartner et al, 1985) y en donde las tasas de GP-170 son mucho mas elevadas que en las líneas testificadas por nosotros. Por este motivo, se ha realizado el ensayo de inmunofluorescencia indirecta mediante el AcMo JSB-1, que permite determinar la expresión del antígeno de membrana en las células en cultivo ensayadas por nosostros, así como estudiar las modificaciones que la CsA a dosis próximas a las terapéuticas y que no tienen efecto antiproliferativo sobre las líneas analizadas, origina sobre ellas. Sin embargo, la utilización de un método indirecto no estequiométrico, dificulta la cuantificación de los resultados. En este sentido, un reciente trabajo realizado sobre células normales en túbulo renal por nuestro grupo de investigación, demuestra niveles de máxima intensidad de tinción para el AcMo JSB-1 de gran selectividad, frente a los resultados obtenidos con C-219, con el inconveniente de que dicho anticuerpo no se encuentra marcado comercialmente. En este trabajo realizado por nuestro grupo, se ha demostrado en la biopsia renal postrasplante, que los niveles máximos de expresión detectados por JSB-1 en túbulo renal normal se corresponden con una intensidad media de tinción para el AcMO C-219 y que los niveles intermedios y bajos de inmunotinción para JSB-1 aparecen negativos con el anterior anticuerpo, lo cual demuestra que en nuestras condiciones experimentales y en el caso de células que no tienen sobreexpresada la GP-170, el AcMo C-219 es de mucha menos especificidad (Gª del Moral et al, 1991).

Para que el AcMo JSB-1 se una a la GP-170, es necesario que la membrana de la célula esté permeabilizada, lo que hace pensar que el epitopo que reconoce es de localización intracitoplásmica (Sherper et al, 1988) muy cercano y unido al epitopo que identifica el AcMo C-219 localizado en la vertiente citoplásmica de la membrana celular (Dalton et al, 1989b). El anticuerpo C-219 detecta un segmento de 6 aminoácidos, que se situan cerca de los dominios ATP-dependientes más próximos al N-terminal (Sheper et al, 1988).

Hay que aclarar que, una vez puesta a punto la técnica de inmunofluorescencia indirecta con el AcMo JSB-1 (para lo cual se realizaron varios ensayos), solo hemos podido repetir las experiencias a 7 y 30 días para cada una de las líneas celulares ensayadas 2 veces, debido al coste tan elevado que supone cada una de las determinaciones, ya que para cada una de las muestras celulares tratadas y no tratadas con CsA hemos trabajado con controles negativos y controles internos frente a citoqueratina.

En relación con nuestros resultados, un objetivo fundamental de este trabajo fué verificar los posibles fenómenos de inducción ó bloqueo de la GP-170, realizados por la CsA a dosis en principio no citotóxicas sobre las líneas celulares ensayadas, para lo cual se hizo el estudio a concentraciones de 0,5 y 1 µg/ml, obteniéndose efectos sobre la modulación de la expresión del antígeno de membrana. En la literatura hemos encontrado, que las concentraciones de CsA utilizadas para la modulación de la GP-170, incluyen un rango muy amplio, dependiendo de las líneas sometidas a tratamiento (Chambers et al, 1989) (Larsson & Nygren, 1990) (Lincke et al, 1990).

Los resultados obtenidos como se ha expuesto anteriormente, demostraron que las líneas celulares ensayadas tienen una relativamente baja expresión de GP-170 en cultivo, cosa que era de esperar puesto que no se han sometido a acción quimioterápica y no se han inducido fenómenos de MDR. La GP-170 está presente, para todas las líneas, en una proporción considerable de las células en cultivo (alrededor del 60%), pero la proporción de moléculas existentes en la membrana es muy baja. En relación con una molécula establecida como es la citoqueratina, que está presente en cantidad mas ó menos constante a nivel del citoplasma y la membrana de las células epiteliales, comparando la expresión de esta molécula con la expresión de GP-170, ésta última es bastante menor. Así, en el caso de la línea celular MCF-7, tras permanecer 7 días en cultivo, el pico modal de citoqueratina está en 160 y su homólogo para la glicoproteina está en 100 para el AcMo JSB-1 cuando la negatividad comienza en el pico modal 60. Aunque las diferencias parecen pequeñas, estamos hablando de una escala logarítmica, lo que las hace bastante notables.

El comportamiento de las líneas ensayadas una vez tratadas con CsA, fué distinto en cuanto a la expresión de GP-170. En el caso de **HeLa**, una línea muy subcultivada que desconocemos el pase en el que se encuentra y donde la morfología celular de partida es poco diferenciada, se observa una disminución espontánea muy notable de la expresión de GP-170 en los controles, como si se produjese un agotamiento de la línea. La CsA a 7 días de tratamiento a concentración de 1 µg/ml no induce ninguna modificación, aunque a 30 días de exposición a la droga, el hecho de que la línea tratada exprese más GP-170 que los controles, habla a favor de una posible selección clonal de células resistentes.

La adquisición de MDR durante ó después del tratamiento está perfectamente documentado, tanto "in vitro" (Herweijer et al, 1990), como en estudios clínicos (Goldstein et al, 1990).

Con estos antecedentes se han realizado trabajos que estudian gran cantidad de neoplasias diferentes, para conocer el grado de presencia de los genes mdr, así como su sobreexpresión mediante la detección de mARN. Goldstein y colaboradores (1989) utilizando esta técnica, mapearon más de 400 neoplasias y a tenor de sus resultados, dividieron a los tumores no tratados en:

a) Neoplasias con altos niveles de mARN del mdr-1 (>50% casos considerados expresan más de 30 U de mARN): carcinoma de colon, renal, hepático, de la corteza adrenal, feocromocitoma, de islotes pancreáticos, leucemia mieloide crónica en fase de crisis, tumor carcinoide.

b) Neoplasias con niveles intermedios (<50% de los casos): leucemia linfoide aguda, leucemia linfoide crónica, linfomas no-Hodgkin y neuroblastomas.

c) Neoplasias con niveles bajos (<30 U ó indetectable): carcinoma de mama, carcinoma de pulmón de célula no pequeña, de vejiga, leucemia mieloide crónica en fase no blástica, cánceres de cabeza y cuello, de esófago, de estómago, melanoma, mesotelioma, ovario, próstata, carcinoma de pulmón de célula pequeña, timoma, tiroides y tumor de Wilms.

d) Neoplasias con niveles altos tras tratamiento: linfomas no Hodgkin, neuroblastomas, feocromocitoma, carcinoma de mama, leucemia mieloide crónica en crisis, leucemia linfoide y no linfoides agudas del adulto.

Para corroborar que en nuestro ensayo con la línea **HeLa** se ha producido un inicio de inducción de fenómeno MDR, haría falta repetir estos ensayos a dosis de CsA superiores a 1

µg/ml y posiblemente en conjunción con alguna droga de acción citotóxica, tal y como se ha comprobado en otras líneas equivalentes derivadas de la línea celular **HeLa** (Gottesman & Pastan, 1988b), determinando simultáneamente la secuencia genética mdr para confirmar que efectivamente estamos seleccionando la clona MDR+. En este sentido, un aspecto controvertido es la secuencia de hechos que ocurre entre el aumento de sobreexpresión de los genes mdr y el aumento de síntesis de los mARN codificados por ellos. Hay publicaciones que indican que previa a la amplificación genética (Shen et al, 1988), se produce un aumento del mARN codificado y por tanto de la transcripción protéica, convirtiéndose en un marcador precoz de MDR. Por el contrario otros trabajos que estudiaron casos clínicos (Bernard et al, 1990) y experiencias "in vitro" (Lemontt et al, 1988) nunca encontraron la supuesta amplificación.

En relación con este fenómeno de selección clonal de células resistentes, en la literatura hemos encontrado trabajos que hablan de las células mutantes de carcinoma KB, una subclona de la línea celular **HeLa**. Estas células fueron escogidas para el estudio porque eran sensibles a drogas, crecían rápidamente, clonaban con alta eficiencia y podían ser seleccionadas por el fenotipo MDR con relativa facilidad (Gottesman & Pastan, 1988b). Las células KB fueron estudiadas en múltiples etapas con drogas que se conoce dan lugar a mutantes MDR, tales como colchicina, doxorubicina y vinblastina. Las células mutantes mostraron una disminución de la acumulación de droga, que se correlaciona con la extensión de su resistencia (Fojo et al, 1985) (Willingham et al, 1986). Esta acumulación disminuida resulta de un eflujo de droga aumentado en oposición a la disminución de la captación (Gottesman & Pastan, 1988b). Todo este fenómeno de selección de MDR está realizado mediante el empleo de quimioterápicos y puede ser comparado con el comportamiento de la línea celular **HeLa**, cuando es tratada con CsA, aunque en nuestro caso, no se trata de una inducción MDR, sino de una selección de la clona resistente a las concentraciones ensayadas de CsA.

En relación con la línea celular **MCF-7**, no se observan diferencias entre la caida de la expresión de GP-170 del control y las células tratadas a 30 días. Sin embargo, es evidente que la CsA induce una deplección precoz de los niveles de GP-170, tal y como está recogido en la literatura en múltiples líneas celulares en cultivo, en donde la CsA induce una disminución a la baja de los genes mdr (Twentyman et al, 1987) (Silverman et al, 1989) (Nooter et al, 1990).

Recientes investigaciones han revelado que, tanto la CsA como algunos agentes calcioantagonistas, interfieren con el funcionalismo de esta glicoproteina (Meador et al, 1987) (Herweijer et al, 1990). El mecanismo de acción de los antagonistas del calcio sobre la P-170 es mediante una unión competitiva (Figueredo et al, 1990) (Mickisch et al, 1990), de igual manera a como lo hacen las drogas quimioterápicas. El mecanismo exacto por el cual la CsA interfiere

con la P-170 no está claro. Presumiblemente, este efecto no está relacionado con el mecanismo responsable de la inmunosupresión, dado que tanto los análogos activos como los inactivos de la CsA pueden provocarlo (Handschumacher, 1991). A este respecto, es necesario considerar los aspectos de funcionamiento de proteinas que se unen a la CsA , sobre todo CaM y CYP. Las líneas de investigación actuales tratan de encontrar la relación existente entre la síntesis y expresión de la CYP y la glicoproteina P-170 en tumores resistentes. Es posible barajar algún mecanismo de reacciones en cadena en los que intervienen segundos mensajeros como el Ca^{++}, inositol trifosfato, diacilglicerol y otros (Exton, 1987), que afectan finalmente al material genético en su expresión, como en cualquier fenómeno celular. Pero además, en células tumorales hay que tener en cuenta que el genotipo está esencialmente alterado, tanto en su cantidad como en su calidad. Varios autores sostienen, que algunos oncogenes deben estar implicados directamente en la expresión ó inhibición de la P-170 (Thorgeirsson et al, 1987) (Geoldstein et al, 1989). Conviene recordar aquí, que la CsA, también tiene efecto inhibitorio sobre algunos oncogenes (Reed et al, 1985) (Reed et al, 1986). De igual manera es importante considerar la expresión de la P-170 como un marcador de diferenciación de células tumorales, tras la exposición de las mismas ante algunas sustancias que muchas de ellas afectan directamente al ADN celular, ó que tienen por sí carácter diferenciador.

El hecho de que un efecto similar al de la CsA sea provocado por los antagonistas del calcio tipo verapamil, ha supuesto el aprovechamiento de la acción sinérgica de ambos fármacos para disminuir la elevada toxicidad de esta sustancia. En el caso del verapamil, a las dosis necesarias para que las neoplasias recuperen su quimiosensibilidad en ensayos in vivo, existe alto riesgo de inducir aritmias e hipotensión severa (Dalton et al, 1989a).

La disminución observada en la expresión de GP-170 en la línea celular **MCF-7** a 7 días de tratamiento con CsA, posiblemente no se produciría de forma tan acusada en la sublínea **MCF-7** MDR+, debido a que no todos los tumores resistentes sobreexpresan la GP-170 y la refractariedad a la quimioterapia puede solamente ser explicado parcialmente por los mecanismos de P-170 (Volm et al, 1991). Batist y colaboradores (1986) describieron una elevada expresión de glutation S-transferasa-π (GST-π) en células **MCF-7** inducidas por doxorubicina. Se ha comprobado que el aumento de los enzimas del complejo glutation en algunas líneas tumorales, como ocurre con las líneas **MCF-7** MDR+, aumenta el poder de detoxicación de las células ante ciertas drogas (Redmond et al, 1991). Alteraciones del contenido de topoisomerasa II, han sido también anunciadas en células P388 MDR por doxorubicina (Deffie et al, 1989). De forma interesante, Fairchild y colaboradores (1987) observan una sobreexpresión simultánea de GP-170 y GST-π en células **MCF-7** inducidas por doxorubicina. Esto plantea la cuestión de si la expresión de ambas proteinas puede estar bajo un control de regulación común (Volm et al,

1991). Por tanto, y como ya se ha dicho en el apartado I-2.1.6.2 de la Introducción, los mecanismos bioquímicos y celulares conocidos que se creen implicados en la MDR son muy variados (Zwelling et al, 1990) (Redmond et al, 1991) (Schwartz et al, 1991) (Toffolli et al, 1991), no pudiéndosele atribuir a la GP-170 más que una parte de ellos (Volm et al, 1991).

En relación con las líneas melánicas, en la línea celular B-16 a los 7 días, tan sólo se experimenta un fenómeno de inducción a la baja de la expresión de GP-170 a 0,5 µg/ml de CsA, de tal manera que, en esta línea altamente proliferativa, la GP-170 pudiera tener una respuesta a baja dosis del fármaco, exactamente igual a lo que ocurre con algunos receptores de superficie celular (Kermani-Arab et al, 1985) (Herold et al, 1986) (Granelli-Piperno et al, 1987). Ahondando en este tema, el trabajo de Lincke y colaboradores (1990) acerca de una línea de melanoma humano, BRO, de comportamiento similar a la línea B-16, a la que se le ha transfectado el gen mdr-1 para estudiar la resistencia a drogas, comunica un efecto similar de la CsA equivalente al descrito por nosotros en la línea B-16. Como en otras líneas celulares MDR+, en la línea BRO se comprobó, que la resistencia a la vincristina puede ser revertida por verapamil y más efectivamente por CsA (Lincke et al, 1990).

Aunque la línea celular B-16 es muy blástica y proliferativa (Fidler & Hart, 1962), se comporta de manera equivalente a las líneas leucémicas, donde la expresión de GP-170 es disminuida por la CsA acompañándose de una inducción a la baja de los genes mdr (Larsson & Nygren, 1990).

La línea SK Mel-5, es la menos proliferativa de las líneas ensayadas y en donde cabe esperar un efecto mas retardado de la droga, por lo que a 7 días no hay modulación de la expresión de GP-170 pero a los 30 días de exposición a la droga, aparece una modulación muy intensa semejante a la de las líneas MCF-7 y B-16, aunque más acentuada y con el hecho muy llamativo, de que la modulación también es mayor en las células tratadas a 0,5 que a 1 µg/ml de CsA, con lo que se obtiene un dato equivalente a la otra línea melánica, B-16.

IV-4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL ANALISIS DE IMAGEN.

En los clásicos trabajos de las líneas celulares en cultivos la valoración de la cantidad de material genético presente en las células, se ha venido haciendo por estudios cariotípicos. En el caso de nuestras líneas, los hallazgos cariotípicos han sido repetidamente descritos (Fidler, 1962) (Jones et al, 1971) (Soule et al, 1973) (Carey et al, 1976).

A partir de 1960, la introducción de los equipos de análisis digital por computador para realizar citología estática y separación celular (Atkin, 1971) (Bohm & Sanddritter, 1975), abrieron amplias perspectivas en cuanto a la posibilidad de cuantificar la cantidad de ADN existente en cada núcleo celular, tanto en líneas de cultivo como en neoplasias humanas. Posteriormente, el advenimiento de la citometría de flujo abrió camino al análisis del estado del ciclo celular en los distintos elementos normales y neoplásicos (Dolbeare et al, 1983) (Clevenger et al, 1985) (Sasaki et al, 1987b). Fué a partir de la década de los 80, cuando el perfeccionamiento de los softwares de análisis digital con automatización de densidad óptica integrada de las estructuras a medir, y del cálculo de la segmentación de la imagen, han hecho posible la realización de técnicas de análisis simultáneo de morfometría nuclear y de cuantificación del ADN por métodos distintos al de la citometría de flujo, que si bien tiene la gran ventaja de realizar un análisis exahustivo del ciclo celular, posee el inconveniente de que no es posible seleccionar de forma interactiva los elementos a cuantificar, evitando la mezcla con elementos normales ó en degeneración a nivel de los cultivos (Carter & Meyer, 1990). En este sentido, las ventajas e inconvenientes de ambos métodos han sido perfectamente sistematizados (Tablas 34 y 35).

En el caso de nuestro trabajo, uno de los objetivos definidos fué ensayar un software de análisis de patente española elaborado por el grupo Texcan (Bacus & Grace, 1987) (Ferrer-Roca, 1986) (Ferrer-Roca, 1990) para comprobar si los resultados obtenidos acerca del crecimiento celular de las líneas y la expresión de glicoproteína tenían alguna repercusión a nivel de la morfometría y densidad óptica integrada de los núcleos celulares.

No se realizó un estudio simultáneo de análisis por citometría de flujo del ADN, porque el citómetro en el que hemos trabajado carece del software necesario para realizar dicho estudio, al tratarse de un citómetro de primera generación dedicado al análisis de marcadores de subpoblaciones leucocitarias en un servicio de Inmunología.

Tabla 34.- Ventajas e inconvenientes de la citometría estática.

Ventajas :

1. Relativa velocidad.
2. Arquitectura de los tejidos mantenida; análisis de las posibles características de los tejidos.
3. Inspección visual durante ó después de la medida.
4. Eliminación de artefactos por programas de ordenador.
5. Detección de células anormales raras por debajo de una frecuencia 1:10.000
6. Datos sobre la presencia de macromoléculas ADN, ARN y modelo de cromatina, forma nuclear, tamaño, superficie.

Inconvenientes:

1. Mas lenta que la citometría de flujo (ICM < 5000 cel/minuto, FCM > 1000 cel/minuto).
2. Requiere una extrema estandarización de la preparación de la célula, fijación y tinción.
3. Precisión de los picos de ploidía (especialmente los valores bajos de ploidía) no óptimos (1 cromosoma de diferencia es la dificultad a detectar).

Tabla 35.- Ventajas e inconvenientes de la citometría de flujo.

Ventajas:

1. Muy rápido y fácil de realizar.
2. Bajo CV de pico diploide, muy precisa determinación de ADN (clase ploidía); diferencia entre cromosomas X e Y detectables bajo condiciones óptimas.
3. Tinción de células en fluidos simples y muy reproducibles.
4. Separación de células vivas.
5. Grandes números de células medidas, fehaciente estadística.

Inconvenientes:

1. La preparación celular tiene que ser óptima (dificultad en detectar artefactos).
2. Insensibilidad para frecuencias bajas de células (por ejemplo menos de 1 en 100).
3. No pueden ser analizados datos del modelo de cromatina.
4. No permite examen de secciones histológicas intactas (pero después de un tratamiento digestivo con enzimas individuales las células pueden ser analizadas).

Tomado de Baak y colaboradores (1985a).

Un inconveniente de la citometría estática que merece la pena comentar es que, es posible la existencia de acabalgamiento de unos núcleos sobre otros, fundamentalmente más en el estudio sobre secciones histológicas que en citologías. En nuestro caso, al ser muestras preparadas especificamente en el laboratorio para citometría estática, se procuró que no ocurriera este artefacto y además en la selección interactiva se eliminaron los posibles solapamientos. De cualquier manera, el software Texcan tiene la posibilidad de rechazar y separar posibles fusiones entre núcleos vecinos. Utilizando este método de evitar los núcleos solapados, Fu y colaboradores (1987) obtienen resultados muy buenos en el análisis citológico de las neoplasias.

En relación con las ventajas que presenta la citometría estática automatizada, hay que decir que es esencial en el caso del estudio de tumores sólidos, porque en ellos la arquitectura tisular conservada es uno de los parámetros fundamentales a evaluar (Gª del Moral y O'Valle, 1992). Sin embargo en el caso de nuestro estudio, hecho sobre células en cultivo, este dato es de menor importancia. No obstante en el presente trabajo, un factor fundamental es la eliminación de los artefactos de forma interactiva por el observador, de forma que es factible desechar todas las posibles células en degeneración que, sin embargo, el citómetro contabiliza en el estudio. Un hecho importante en nuestro trabajo y que no podría obtenerse por citometría de flujo es que, el patrón de cromatina fina ó gruesa que se ha revelado como un parámetro esencial para diferenciar unas líneas de otras y sobre todo para analizar el influjo de la CsA sobre cada línea determinada, no puede ser analizado. En este sentido, existen numerosos estudios que han demostrado que incluso cuando la frecuencia de células tumorales es muy baja, 1 entre 10.000, se obtienen resultados estadísticamente significativos mediante citometría estática (Verwoerd et al, 1987) (Lee et al, 1989).

En relación con el método de análisis, hay que mencionar que el software utilizado TEXCAN, es un software automatizado en el que la interacción entre el observador y el programa es mínimo, de forma que solo se realiza interactivamente la segmentación (Abmayr et al, 1987). Además es un programa que está especialmente definido para la realización de estudios sobre citologías y no sobre secciones histológicas (Ferrer-Roca et al, 1988).

Un hecho a resaltar es que en todos los casos, la segmentación se realizó sobre imágenes digitalizadas a 256x256 pixeles, que se ha demostrado como una resolución suficiente para el análisis practicado.

En relación con el método de tinción de ADN, en nuestro trabajo hemos optado por la realización de hematoxilina progresiva de Mayer por ser considerado un método mas sutil que la clásica tinción de Feulgen para la coloración homogénea de los núcleos (Ferrer-Roca, 1989a).

En el caso de la tinción de Feulgen, como ha sido recogido en repetidas ocasiones (Feulgen & Rossenbeck, 1924) (Stevens & Bancroft, 1990), el punto crucial es la hidrólisis previa a la tinción, que aunque esté estandarizada en un laboratorio, siempre origina problemas en la intensidad de coloración entre muestras teñidas en diferentes tiempos. En condiciones muy exactas de fijación y con un control muy estricto de hidrólisis, se obtienen con el Feulgen muy buenos resultados (Thunnissen et al, 1981). En el caso de la hematoxilina progresiva de Mayer no existe el problema de la hidróiisis siempre y cuando la solución de hematoxilina no esté diluida ni envejecida.

En relación con el número de células medidas, para nuestro estudio hemos analizado 100 núcleos celulares siguiendo la sistemática de otros autores que analizan también células tumorales en cultivo (Auer et al, 1980). Aunque en el estudio de neoplasias muy diferenciadas, como ocurre con el carcinoma folicular del tiroides donde la similitud con las células normales es muy grande, se recomienda tomar para el estudio entre 200 a 300 núcleos (Ferrer-Roca, 1990).

En el caso de líneas tumorales fuertemente anaplásicas, Thunnissen y colaboradores (1988b) refieren que la medicion de tan) 25 núcleos fué suficiente para diferenciar entre carcinoma de pulmón y elementos celulares de otra naturaleza. A este respecto, pensamos que para nuestras líneas celulares que son fuertemente anaplásicas, el haber escogido 100 células hace imposible un error de muestreo. La medición siempre se hizo al azar como en otros trabajos encontrados en la literatura (Auer et al, 1980).

En relación con la morfometría, los estudios clásicos de Pahlplatz y colaboradores (1986) y Thunnissen y colaboradores (1988a) definen 5 categorías posibles de análisis a practicar:

- Estudios geométricos relativos a la forma y tamaño de los núcleos.
- Estudios densitométricos relativos a la densidad optica integrada del material cromatínico.
- Análisis textural, donde se analiza la distribución espacial de las distintas densidades de ADN medidas por niveles de gris (Young et al, 1986).
- Análisis colorimétrico debido a la saturación y luminancia de color de la imagen nucleocitoplásmica.
- Análisis topográfico derivado de las relaciones que tienen las diferentes estructuras entre si.

Debido a que se ha utilizado un software que funciona con una tarjeta digital en blanco y negro, no ha sido posible realizar estudios colorimétricos. De igual forma, al tratarse de un

análisis sobre preparaciones citológicas no se han hecho estudios topográficos. Por ello realmente los datos de morfometría referidos son relativos a estudios geométricos, densitométricos y texturales de los núcleos celulares. En el primer caso, se han valorado parámetros de forma y tamaño nuclear. En el segundo, se ha hecho densitometría de ADN y en el tercer caso se ha analizado la granulometría fina y gruesa dentro de los núcleos como análisis textural.

Hay que tener en cuenta que el nivel de umbralización seleccionado fué el mismo para todas las líneas celulares, al ser teñidas las preparaciones simultáneamente y captadas las imágenes en las mismas condiciones, sin intentar adecuar los niveles de grises a las particularidades texturales nucleares de cada línea. En general, el parámetro granulométrico que creemos de mayor valor dentro de los evaluados, es el que se refiere al área media granular ocupada por los distintos tipos de cromatina, eu y heterocromatina, porque independientemente del número de gránulos presentes en cada célula, es el que verdaderamente indica la superficie total ocupadada por la cromatina.

En los núcleos existen dos tipos de cromatina, eucromatina, cromatina no granular desespirilizada donde se está realizando la transcripción genética y heterocromatina granular; cuanto mayor es la cantidad de esta última menor es la actividad nuclear (Fawcett, 1987).

En el estudio morfométrico de los controles, las diferencias observadas no hacen mas que resaltar el distinto carácter de cada una de las líneas celulares. En el caso de nuestro trabajo no hemos encontrado referencias acerca de análisis mediante estudio computarizado de las líneas celulares ensayadas, sin embargo si hay numerosas descripciones en homólogos humanos.

En el cancer de mama, el dato de mayor importancia clásicamente ha sido la cuantificación de los receptores de estrógenos en las células tumorales mediante inmunocitoquímica (Guazzi et al, 1985). Sin embargo, los datos morfométricos de análisis citométrico de ADN, no se han demostrado absolutamente concluyentes, si bien pueden ser de ayuda adicional (Baak et al, 1991b). En el caso de la línea celular MCF-7, se trata de una línea receptor de estrógenos positiva como se ha demostrado en múltiples estudios (Broocks et al, 1973) (Bonney et al, 1985), sin embargo no existen datos de citometría estática sobre la misma. En nuestro trabajo, un dato importante a tener en cuenta, es que los resultados del estudio morfométrico mediante análisis de imagen son muy significativos, en el caso de la línea MCF-7 tratada con 1 µg/ml de CsA. En esta línea se observa una disminución estadísticamente significativa del tamaño, perímetro y diámetro nuclear con aumento en el número de gránulos finos y gruesos.

Por ello y globalmente si en la línea **MCF-7** disminuye el tamaño del núcleo y aumenta la granularidad, este hecho apoya la existencia de núcleos mas inactivos, probablemente porque se interrumpe la transmisión de mensajes al núcleo y no existe una buena transcripción genética tal y como ha sido descrito repetidamente que actúa la CsA (Citterio & Kahan, 1989) (Kimball et al, 1991). Esto requiere ulteriores testificaciones de este efecto mediante citometría de flujo.

En la otra línea epitelial que ha sido muy subcultivada, la línea **HeLa**, no se observan modificaciones estadísticamente significativas en la morfometría, lo cual confirma que la CsA a 1 µg/ml no tiene efecto sobre dichas células.

En relación con el grado de anaplasia mostrado por la línea **HeLa**, existen múltiples trabajos donde se ha relacionado el grado de aneuploidía con la agresividad del tumor clínico en el carcinoma epidermoide de cuello de útero (Fu et al, 1981) (Goppinger et al, 1986), aunque también se han publicado patrones diploides en carcinomas de células escamosas de cuello de útero (Oud et al, 1987). En nuestra línea, posiblemente la realización de gran número de subcultivos influye en este fenómeno.

En el caso de las líneas melánicas, existen múltiples estudios clínicos de morfometría para discriminar entre las lesiones nevoides benignas y el melanoma maligno (Smolle et al, 1988). En algunos casos incluso se han realizado técnicas de impregnación argéntica complementarias en morfometría, para diferenciar estas lesiones (Leond & Gilham, 1989). En líneas celulares, no hemos encontrado referencias bibliográficas donde se practique este análisis.

En la línea celular SK **Mel-5** tratada con CsA, se observa un aumento de todos los parámetros geométricos así como de la granulometría gruesa, consiguiendo significación estadística para dichos valores. Este hecho podría ser debido a que en la línea **SK Mel-5** existen dos poblaciones celulares, una de células grandes diferenciadas con alto contenido melánico y otra de células pequeñas que mantienen el crecimiento del cultivo (Carey et al, 1976). Por ello, cabría explicar el efecto de la CsA como un fenómeno de eliminación ó de efecto bloqueante sobre las células madre que mantienen la población, con un escaso efecto sobre las células diferenciadas de mayor tamaño que son por tanto, más anaplásicas.

En la línea **B-16** ocurre una disminución estadísticamente significativa del área celular, el perímetro y el diámetro nuclear al igual que ocurre en la línea **MCF-7**, observándose también un incremento tanto en la granulometría gruesa como en la fina. Este efecto podría tener una explicación equivalente al referido para la línea **MCF-7**.

Establecida la comparación de las líneas estudiadas con células mesenquimales normales, se constata que el tamaño nuclear de las líneas tumorales es mayor estadísticamente significativo y un dato a destacar es que una vez tratadas las monocapas celulares con CsA, las células que se mantienen en cultivo presentan un área nuclear menor que las células mesenquimales normales, en el caso de las líneas **MCF-7** y **B-16**, que podría ser debido a una inactivación nuclear que haría a los núcleos tumorales más proximos a los normales en cuanto a su contenido en heterocromatina. En la línea **HeLa** no se produce modificación, mientras que la línea celular **SK Mel-5** incrementa su tamaño.

Si realizamos un estudio comparativo entre los resultados del análisis de imagen, crecimiento celular y la expresión de GP-170 en las líneas celulares ensayadas, podría concluirse que, en el caso de la línea celular **HeLa**, no hay modificaciones estadísticamente significativas, ni en la morfometría ni en la granulometría y es la línea en la que menos se modifican los valores de GP-170 al ser tratada con CsA, de forma que el comportamiento de los controles y células tratadas es equivalente. Todo ello confirma el nulo efecto de la CsA sobre dicha línea celular.

Curiosamente, en la línea **MCF-7** los valores de GP-170 demuestran una menor presencia en la membrana de esta proteína. En este sentido los resultados del análisis de imagen que revelan un núcleo escasamente activo, sugieren una disminución de la síntesis de proteínas, entre ellas GP-170 que disminuirá sobre la superficie celular.

En nuestro trabajo, aun no teniendo estudio genético, la hipótesis de que la CsA, mas que inactivar directamente a la GP-170 provoca una interrupción del mensaje nuclear impidiendo la transcripción genética con menor significado de los genes mdr y por tanto con menor glicoproteína en la línea **MCF-7**, cobra valor (Handschumacher, 1991) (Kimball et al, 1991).

En relación con la línea **SK Mel-5**, a favor del efecto bloqueante sobre las células madre que mantienen la población y un escaso efecto sobre las células diferenciadas de mayor tamaño, en nuestro estudio hay dos evidencias: 1º) Que pese al cambio morfométrico no se modifican los valores de GP-170, lo cual hace poco probable que el aumento del núcleo sea debido a una adaptación celular ya que si así fuera, la repercusión que cabría esperar de esa adaptación celular sería un aumento en la GP-170 como una proteína más en la superficie celular y 2º) También a favor de la hipótesis de que se trata de una acción selectiva sobre las células madre más sensibles, es que precisamente este efecto ocurre en la línea **SK Mel-5** en la que el IC50 es más bajo y por tanto el efecto a baja dosis es mayor. Por tanto podría decirse que a base de evidencias indirectas deducidas de la serie, es posible que en la línea **SK Mel-5**, la CsA origine

un cierto efecto antiproliferativo sobre las células madre indiferenciadas, lo cual explicaría ese efecto contradictorio de mayor presencia de núcleos grandes y anaplásicos en las células después del cultivo con CsA. De cualquier forma, es probable que el efecto antiproliferativo sea leve y el hecho de que el % de supervivencia sea de 103% a 1 µg/ml hay que verlo en el contexto de que se trata de la línea menos proliferativa, donde observar fenómenos de crecimiento celular incluso en los controles no tratados ya es difícil.

En la línea **B-16** el efecto originado en los parámetros morfométricos por la CsA puede explicarse de forma equivalente a los observados en la línea **MCF-7**, existiendo ciertas diferencias entre ellas, ya que la acción antiproliferativa es menor en la línea **B-16**, la expresión de GP-170 no se modifica a 1 µg/ml pero si a 5 µg/ml de CsA y las tasas de modificación del área y perímetro nuclear de las células no tratadas y tratadas son menores. Por estos motivos el efecto de la CsA en general, puede considerarse más acentuado en la línea de carcinoma de mama que sobre la línea melánica **B-16**.

IV-5.- DISCUSION SOBRE LA DETERMINACION DE CsA MEDIANTE RIA.

Uno de los objetivos planteados en el presente trabajo, fué valorar la incorporación de CsA a las células en cultivo a partir de la medición de los restos del fármaco en el sobrenadante, considerando que éste es sustraido del mismo por las células, aparentemente mediante un mecanismo de incorporación inactiva por disolución en los sistemas membranosos celulares. Para ello se recogieron todos los sobrenadantes y se procesaron por el ensayo de RIA estándar, diseñado para el control sérico de los niveles de CsA en los pacientes trasplantados.

Sorprendentemente todos los resultados obtenidos mediante este test fueron absolutamente discordantes y no pudieron ser utilizados para la confección de los resultados, aún encontrándose en el rango de lectura del sistema de RIA. Probablemente este hecho sea debido a la calibración del test de RIA, ya que el método con el que se analizaron las muestras está preparado para la investigación en sangre total previa lisis de los hematíes, y en nuestro caso, los sobrenadantes de los cultivos iban vehiculizados en medio MEM con 5% SBFI v/v. A favor de esta hipótesis, está la comprobación que realizamos cuando se testificaron líquidos de control con concentraciones conocidas de CsA, previamente preparadas a partir de CsA sustancia base ó ciclosporina obtenida de la solución endovenosa comercial Sandinmunn^{R} SANDOZ, ya que se producía un resultado semejante, es decir, no había concordancia entre la concentración puesta en el control y la testificación que realizaba el sistema de RIA. Probablemente, para confirmar este hecho sería necesario realizar un estudio simultáneo de HPLC y de RIA calibrado para medios de cultivos escasos ó pobres en proteínas.

Nosotros seleccionamos el método RIA porque requiere una pequeña cantidad de muestra (50 µl) (Huang et al, 1987) y está estandarizado en la unidad de Inmunología del Hospital de la S.S. Virgen de las Nieves de Granada que colabora con nosotros. A posteriori pensamos que podíamos haber realizado el HPLC, ya que es capaz de medir específicamente CsA y niveles de metabolitos de CsA individuales, aunque no es muy aconsejable para mediciones rutinarias donde grandes números de muestras son utilizados (Lensmeyer et al, 1987) (Shah & Sawchuk, 1988).

Alternativamente, se ha diseñado un método mas exacto por Küilinger y colaboradores (1990), que mide selectivamente CsA y sus metabolitos bioactivos en sangre humana (Steiner et al, 1988) y que pensamos incorporarlo en el futuro. En este ensayo el receptor intracelular de la CsA (CYP) se usa como una proteína de unión aprovechando su capacidad para unir CsA de acuerdo con su poder inmunosupresor (Handschumacher et al, 1984) (Quesniaux et al, 1987a). Por tanto un sistema de ensayo usando CYP en vez de anticuerpos reaccionando de forma cruzada es capaz de medir CsA y su unión a CYP, es decir, también mide los metabolitos inmunosupresores (Durette et al, 1988).

El ensayo unión-CYP (CYPBA) (Steiner et al, 1988) fué usado junto un RIA policlonal y HPLC utilizando como líquidos biológicos tanto suero como sangre total, y con la finalidad de estudiar la farmacocinética y el metabolismo de CsA en 19 pacientes con hemodiálisis. Los resultados obtenidos concluyeron: 1º) existió un crecimiento continuo en la razón metabolitos/CsA (RIA/HPLC), 2º) después de haber alcanzado su punto mas alto, la cantidad relativa de metabolitos bioactivos (unidos a CYP) disminuyó (CYPBA/HPLC), 3º) la razón metabolitos bioactivos/CsA (CYPBA/HPLC) fué variable a través del periodo de observación, pero incluso después de 12 horas permanecía del mismo orden que en el momento del pico (de 1-5 horas), esto parece ser un indicador de una continua metabolización del componente madre en metabolitos primarios inmunosupresores como M1 ó M17 (Ryffel et al, 1986) (Dindzans et al, 1987) (Steiner et al, 1988).

Siguiendo en la misma línea de trabajo, Paul y colaboradores (1991) han desarrollado un ensayo competitivo de unión conocido como LH-20 para medir la concentración de CsA y sus metabolitos que se unen a CYP (Zeevi et al, 1988) (Rosano et al, 1990), en extractos de sangre total de receptores de órganos trasplantados (Lorber et al, 1990). Las concentraciones medidas usando el ensayo LH-20 excedieron a las obtenidas mediante la técnica de HPLC en sangre total en el 57% de los 134 análisis (Lorber et al, 1990). El propósito de este estudio fué determinar si los resultados obtenidos con el competitivo ensayo de unión a CYP (LH-20), se correlacionan con la suma de CsA y sus metabolitos individuales determinados por HPLC en sangre total. Aunque la mayoría de los metabolitos son menos potentes que la CsA como inmunosupresores,

su contribución colectiva a la actividad total inmunosupresora parece de forma probable ser significativa. La cantidad y proporción de CsA y algunos de sus metabolitos pueden variar dependiendo de variables clínicas específicas de pacientes. El método LH-20 puede proporcionar una más exacta valoración de inmusupresión y/ó información de efectos tóxicos potenciales (Paul et al, 1991).

CONCLUSIONES

1.- Las líneas ensayadas en este estudio han mostrado diferente sensibilidad al ser tratadas con CsA, observándose el mayor efecto antiproliferativo sobre la línea **SK Mel-5** de melanoma y el mímino sobre la línea celular **HeLa**.

2.- El test del MTT se ha mostrado como un método indirecto de utilidad para valorar el número de células existentes en los cultivos. Sin embargo, la concentración de reactivo, MTT, a utilizar para cada una de las líneas celulares, debe ser adaptada a la distinta capacidad reductora que posee cada una de ellas.

3.- En relación con el método para la determinación de la glicoproteína P-170, en nuestras condiciones de ensayo, el AcMo C-219 se ha mostrado poco útil debido a que sólo detecta la presencia de dicha glicoproteína cuando está presente en un número elevado de moléculas por célula. Por el contrario, la expresión de la glicoproteína P-170 ha podido ser demostrada de manera aceptable, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, mediante el AcMo JSB-1, aún siendo reducida la expresión de esta glicoproteina en las líneas testificadas.

4.- La determinación de la concentración de CsA y sus metabolitos mediante el test de RIA, en las condiciones estándar de calibración del método, es ineficaz para identificar las concentraciones de esta droga en los sobrenadantes de los cultivos.

5.- Sobre la expresión de glicoproteína P-170 en la línea celular **HeLa**, la CsA produce un efecto estimulante a largo plazo, probablemente vinculado a una selección de la clona celular resistente a esta droga.

6.- Sobre el resto de las líneas, la CsA en general provoca una disminución de la expresión de la cantidad de glicoproteína P-170, lo cual podría depender de una interrupción en la trasmisión de mensajes entre el nucleo y el citoplasma celular inducida por el fármaco.

7.- El análisis de los parámetros de morfometría y densitometría de las líneas ensayadas en cultivo, permite percibir modificaciones sutiles de las células inducidas por la CsA, no apreciables con los métodos estándar de evaluación del crecimiento.

8.- La determinación simultánea de la inhibición del crecimiento celular mediante el test del MTT y análisis digital de imagen, concentración de droga en los sobrenadantes de medios de cultivo por RIA y valoración de GP-170 mediante citometría de flujo, puede constituir un modelo de validación "in vitro" para la testificación de sustancias y fármacos que interfieren con los fenómenos de multirresistencia a drogas.

BIBLIOGRAFIA

ABBOT LB, PIPPENGER CE. Cyclosporine: Its clinical utility, methods of analysis, and TDM. Diag Med. 1985; 8: 36-42.

ABMAYR W, MANNWEILER E, OESTERLE D, DEML E. Segmentation of scenes in tissue sections. Anal Quant Cytol. 19 , 9: 190-196.

ACKERMAN M, BRANDT L, JOHNSON A, OLSON H. Mitotic activity in no-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to prognosis. Br. J. Cancer. 198 , 55: 219-223.

ALBERTS DS, CHEN HS, SOEHNLEN B, et al. In vitro clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer chemoterapy. Lancet. 1980; 2: 340-342.

ALBERTS DS, SALMON SE, CHEN HS, et al. Pharmacologic studies of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. Cancer Chemother Pharmacol. 1981; 6: 253-264.

ALLEY MC, LIEBER MM. Measurement of human tumor cell growth in soft agar cultures using computes-assisted volumen analysis. Br J Cancer. 1985; 52: 205-214.

ALLEY MC, SCUDIERO DA, MONKS A, et al. Feasibility of drug sreening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res. 1988; 48: 589-561.

ALVARO T. Inducción de la diferenciación celular mediante productos químicos en la línea de glioma de rata C-6. Tesis doctoral leida en la Universidad de Granada. 1989.

ANDERSSON A, BORG H, HALLBERG A, HELLERSTRÖM C, SANDLER S, SCHNEL Long-term effects of cyclosporin A on cultured mouse pancreatic islets. Diabetologia. 19 27: 66-69.

AOYAMA T, YAMANO S, WAXMAN DJ, et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. J. Biol. Chem.. 1989; 264: 10388-10395.

ATKIN NB. Model DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia: a clinical and histopathologic assessment. Cancer. 1971; 27: 1064-1073.

ATKINSON K, BRITTON K, PAULL P, et al. Detrimental effect of intestinal disease on absorption of orally administered cyclosporine. Transplant Proc. 1983; Vol XV, No 4: 2446-2449.

ATKINSON K, BRITTON K, PAULL P, FARRELL C, CONCANNON A, DODDS A, BACHINGER HP. The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the in vitro folding of type III collagen. J Biol Chem. 198 262: 17144-17149.

AUER G, CASPERSSON T, WALLGREN DNA content and survival in mammary carcinoma. Anal Quant Cytol. 19 3: 161-165.

AXIOTIS C, MONTEAGUDO C, MERINO MJ, LA PORTE N, NEUMANN R. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma. Am J Pathol. 1991; 138: 799-806.

AZOGUI O, GLUCKMAN E, FRADELIZI D. Inhibition of IL-2 production after human allogenic marrow transplantation. J Immunol. 1983; 131: 1205-1208.

BAAK JPA, LOWE J, OORT J, PLOEM JS. Equipment for quantitative cell and tissue analysis. In: Baak JPA. Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and progrosis. Ed. Springer-Verlag. Berlin. 1991a; p. 57-76.

BAAK JPA, VAN DIEST PJ, FLEECE JC. Morphometric and combined morphometric-DNA Cytometric Applications. In: Baak JPA. Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis. Ed. Springer-Verlag. Berlin. 1991b; p. 269-450.

BACUS JW, GRACE LJ. Optical microscope system for standardized cell measurements and analysis. Appl Optics. 1987; 26: 3280-3293.

BATES SE, SHIEH C, TSOS M. Expression of mdr-1/P-glycoprotein in human neuroblastoma. Am J of Pathology. 1991; 139, No. 2: 305-315.

BATIST G, TULPULE A, SINHA BK, KATKI AG, MYERS CE, COWAN KH. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. J Biol Chem. 1986; 261: 15544-15549.

BENARD J, DA SILVA J, RIOU G. Culture of clonogenic cells from various human tumors: Drug sensitivity assay. Eur J Cancer Clin Oncol. 1983; 70: 1027-1032.

BENARD J, BOURHIS J, RIOU G. Clinical significance of multiple drug resistance in human cancer. Anticancer Research. 1990; 10: 1297-1302.

BENNETT WM, NORMAN DJ. Action and toxicity of cyclosporine. Ann Rev Med. 1986; 37: 215-224.

BERTELSEN CA, SONDAK VK, MANN BD, KORN EL, KERN DH. Chemosensitivity testing of human solid tumors. A review of 1582 assays with 258 clinical correlations. Cancer. 1984; 53: 1240-1245.

BERTONCELLO J, BRADLEY TR, CAMPBELL JJ, et al. Limitations of the clonal agar assay for the assessment of primary human ovarian tumour biopsies. Br J Cancer. 1982; 45: 803-811.

BEVERIDGE T, GRATWOHL A, MICHOT F, et al. Cyclosporin A: Pharmacokinetics after a single dose in man and serum levels after multiple dosing in recipients of allogenic bone marrow grafts. Curr. Ther. Res. 1981; 30: 5-17.

BICKIS IJ, HENDERSON MD, QUASTEL JH. Biochemical studies of human tumor slice to chemotherapeutic agents. Cancer. 1966; 19: 103-113.

BIEDLER JL, RIEHM H. Cellular resistencia to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance, radioautographic and cytogenetic studies. Cancer Research. 1970; 30: 1174-1184.

BIGGS J. Detrimental effect of intestine disease on absorption of orally administred cyclosporine. Transplant. Proc.. 1983; 15: 2246-2249.

BLACK MM, SPEER FD. Further observations on the effects of cancer chemotherapeutics agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. J Natl Cancer Inst. 1954; 14: 1147-1158.

BLOCK JB, CHLEBOWSKI RT, DIETRICH MF, et al. Abnormal deoxyuridine supression test as a rapid predictor for antimetabolite chemosensitivity: correlation with in vitro test of growth inhibition. Cancer Treat Rep. 1984; 68: 631-636.

BOHM N, SANDDRITTER W. DNA in human tumors. A cytophotometric study. Curr Top Pathol. 1975; 60: 152-214.

BONNEY RC, REED MJ, JAMES VH. Kinetic studies of estradiol 17β-hidroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 mammary cancer cells. J. Steroid. Biochem. 1985; 23: 1079-1081.

BOREL JF. Comparative study in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated citotoxicity. Immunology. 1976; 31: 631-641.

BOREL JF, FEURER C, GUBLER HU, STAHELIN H. Biological effect of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions 1976; 6: 468-475.

BOREL JF. Cyclosporine: historical perspectives. Transplant Proc. 1983; 15: 3-13.

BOREL JF, RYFFEL B. The mechanism of action of cyclosporine: a continuing puzzle. In: Schindler R. Cyclosporine in Autoimmune Diseases. Ed. Springer Verlag. New York. 1985. p. 25-32.

BOREL JF. Basic science summary. In: Schindler R. Cyclosporine: Nature of the agent end its Immunologic Actions. Ed. Grune & Stratton. New York. 1988: p. 722-730

BOUCLIER M, ELBAZE P, MILANO G, SHROOT B, ORTONNE JP. Hyper-induction of skin ornithine decarboxylase activity in psoriatic patients. Br J Dermatol. 1986; 115: 193-198.

BOURBIGOT B, GUISERIX J, ADRIAU J, et al. Nicardipine increases cyclosporine blood levels. Lancet. (letter). 1986; 1: 1447.

BOWERS LD, CANAFAX DM. Cyclosporine: Experience with therapeutic monitoring. Ther. Drug. Monit. 1984; 6: 142-147.

BOYD MR. Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and practice of Oncology Update. Philadelphia. Lippincott. 1989; 3: 1-12.

BRAYLAN RC, BENSON NA, NOURSE V, KRUTH H. Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens, and light scatter of human lymphoid cells. Cytometry. 1982; 2: 337-343.

BROCKS SC, LOCKE ER, SOULE HD. Estrogens receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. J. Biol. Chem. 1973; 248: 6521-6523.

BROWN Z, NEILD GH, LEWIS GP. Inhibition of prostacyclin formation by cyclosporin is not due to reduced availability of arachidonic acid in membrane phospholipids of cultured human endothelial cells. Biochemical Pharmacology. 1990; 39: 1136-1138.

BROXTERMAN HJ, PINEDO HM, KUIPER CM, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in human tumor cells with a low degree of drug resistance. Int J Cancer. 1989; 43: 340-341.

BURCKART GJ. Excretion of cyclosporine and its metabolites in human bile. Transplant. Proc.. 1986; 18, Suppl. 5: 46-49.

BURCKART GJ, VENKATARAMANAN R, PTACHCINSKI RJ, et al. Cyclosporine absorption following orthotopic liver transplantation. J Clin Pharmacol. 1986 647-651.

BURCKLE WS. Cyclosporine pharmacokinetics and blood level monitoring. Drug Intell Clin Pharm. 1985; 19: 101-109.

CALABRESI P, CHABNER BA. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. En: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Panamericana. Madrid. 1991; p. 1163-1222.

CALLEN DF, BAKER E, SIMMERS RN, SESHEDRI R, RONINSON IB. Localization of the human multiple drug resistance gene mdr1, to 7q21.1. Human Genet. 1987; 77: 142-144.

CALNE RY, THIRU S, McMASTER P, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. Lanect 1978; 2: 1323-1327.

CAREY TE, TAKAHASHI T, RESNICK LA, et al. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemaadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. Proc Natl Acad Sci. 1976; 73: 3278-3282.

CARNEY DN, WINKLER CF. Análisis in vitro de la quimiosensibilidad terapéutica. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Avances en Oncología. Ed. Expaxs S.A. Barcelona. 1985; p. 109-137.

CARTER NP, MEYER EW. Introduction to the principles of flow cytometry. In: Ormerod MG. Flow Cytometry. A practical approach. Ed. IRL Press. Oxford. 1990; p. 1-28.

CASALS D, CORDON-CARDO C. Resistencia a múltiples fármacos. Implicaciones biológicas y clínicas. Med Clin (Barc). 1989; 93: 181-185.

CASTELL JV. Los modelos alternativos in vitro: Posibilidades y limitaciones. Actas I Jornadas de validación de modelos alternativos "in vitro". 1992; p. 10-12.

CHABNER BA, GOTTESMAN MM. Meeting Highlights: Willian Guy Forbeck Foundation Think Thak on "Multidrug resistance in cancer chemotherapy". J Natl Cancer Inst. 1988; 6: 391-394.

CHABNER BA. In defense of cell-line screening. J Natl Cancer Inst. 1990; 82: 1083-1085.

CHAMBERS SK, HAIT WN, KACINSKI BM, KEYES SR, HANDSCHUMACHER RE. Enhancement of anthracycline growth inhibition in parent and multidrug-resistant chinese hamster ovary cells by cyclosporin A and its analogues. Cancer Research. 1989; 49: 6275-6279.

CHAMORRO MERINO G, GONZALEZ ALFONSO M, CORREDOIRA AMENEDO J. Ciclosporina: Estudio farmacocinético y analítico. Experiencia clínica. Farmacia clínica. 1987; 4,1: 12-29.

CHRISTIANS U, SCHLITT HJ, MAURER G, BLECK J, WONIGERT K, SEWING K. Measurement of cyclosporine and 18 metabolism blood, bile and urine by high performance liquid chromatography. Transplant. Proc. 1988; 20: 609-613.

CITTERIO F, KAHAN BD. The inhibitory effect of cyclosporine on the nuclear proliferative response to a variety of T cell activators. Transplantation. 1989; 47: 334-338.

CLEVENGER CV, BAUER KD, EPSTEIN AL. A method for simultaneous nuclear immunofluorescence and DNA content quantification using monoclonal antibodies and flow cytometry. Cytometry. 1985; 6: 208-214.

COLOMBANI P, ROBB A, HESS A. Cyclosporin A binding to calmoduline:a posible site of action on T-lymphocyts. Science. 1985; 228:337-339.

COLOMBANI P, BRIGHT E, MONASTYRSKYS O, HESS A. Subcellular action of cyclosporine: interaction between CSA and calmoulin antagonists. Transplant Procc. 1987; 19: 1171-1174.

COOLEY D, FRAZIER O, PAINVIN G, et al. Cardiac and cardiopulmonary transplantation for immunosupression. Recent Texas Heart Institute experience. Transplant Procc. 1983; 15 (4.suppl.1): 2567-2572.

COON JS, WEINSTEIN RS. Specimen preparation, cell measurements, and probes for flow cytometry. In: Coon JS, Weinstein RS, and Kaufman N. Diagnostic flow cytometry. Ed. Willians & Wilkins. Baltimore. 1991; p. 35-43.

CORDON-CARDO C, O' RIEN JP, BOCCIA J, CASALS D, BERTINO JR, MELAMED MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Cytochem. 1990; 38: 1277-1287.

CROOP JM, RAYMOND D, HUBER A, et al. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. Moll. Cell Biol. 1989; 9: 1346-1350.

CROSLAND-TAYLOR PJ. A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. Nature. 1953; 171: 37-45.

DAIDONE MG, SILVESTRINI R, SANFILIPO O, et al. Reliability of an in vitro short-time assay for predict the drug sensitivity of human breast cancer. Cancer. 1985; 56: 450-456.

DALGARNO D, HARDING N, LAZARIDES A, et al. ^{1}H NMR studies on bovine cyclophilin: Preliminary structural characterization of this specific cyclosporin A binding protein. Biochemestry. 1986; 25: 6778-6784.

DALTON WS, DURIE BGM, ALBERTS DS, GERLACH JH, CRESS AE. Characterisation of a new drug resistant myeloma cell line which expresses p-glycoprotein. Cancer Res. 1986; 46: 5125-5130.

DALTON WS, GROGAN TM, MELTZER PS, et al. D esistance in multiple mieloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-Glycoprot and potential circumvention by adiction of Verapamil to Chemotherapy. Am. Soc. Clin. Onc 1989a; 7: 415-424.

DALTON WS, GROGAN TM, RYBSKI JA, et al. Immunohistochemical detection and quantitation of P-glycoprotein in multiple drug- resistant human myeloma cells: associatic with level of drug resistance and drug accumulation. Blood. 1989 b; 73: 747-752.

DANIEL T, IVES H. Cyclosporin A inhibits kinase C-independent activation of the Na^{+}/H^{+} exchanger by PDGF and vanadate. Biochem Biophys Res Commun. 1987; 145: 111-117.

DANIELS NJ, DOVER JS, SCHACHTER RK. Inteaction between cyclosporine and rifampicin. Lancet (letter). 1984; 2: 639.

DARDENNE M, SAVINO W, FEUTREN G, BACH JF. Stimulatory effects of cyclosporin A on human and mouse thymic epithelial cells. Eur J Immunol. 1987; 17: 275-279.

DARZYNKIEWICZ Z, TRAGANOS F, STAINO-COICO L. Cell and nuclear growth during G1: kinetic and clinical implications. Ann NY Acad Sci. 1986; 468: 45-54.

DEFFIE AM, BATRA JK, GOLDENBERG GK. Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in Adriamycin-sensitive and -resistant P 388 leukemia cell lines. Cancer Res. 1989; 49: 58-62.

De GROEN PC, AKSAMIT AJ, RAKELA J, FORBES GS, KROM RAF. Central nervous system toxicity after liver transplantation: The role of cyclosporine and cholesterol. N Engl J Med. 1987; 317: 860-861.

DELTZ E, ULRICHS K, ENGEMANN R, et al. Prevention of graft -versus- host reaction following small bowel transplantation by temporary cyclosporine treatment. In Kahan (Ed.) Cyclosporine: biological activity and clinical applications. Cirune & Stratton. Orlando. Florida. 1984: 811-815.

DERAY G, LE HOANG P, CACRUB P, et al. Oral contraceptive interaction with cyclosporin. Lancet. 1987; 1: 158-159.

DeVITA VT. Principios de quimioterapia. En DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer principios y prácticas de oncología. Ed. Salvat, Tomo I; 1988; p. 238-265

DIEPERINK H, MOLLER J. Tetoconazole and cyclosporine. Lancet (letter). 1982; 2: 1217.

DIERENDONCK JH VAN, KEIJEZER R, VAN DE VELDE CJH, CORNELISSE CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. Cancer Res. 1989; 49: 2999- 3006.

DINDZANS VJ, WONG PY, MEE AV, et al. Cyclosporine metabolites suppress T cell proliferation induced by concanavalin A. Transplant. Proc. 1987; 19: 3490-3493.

DIPAOLO A, DOWD JE. Evaluation of inhibition of human tumor tissue by cancer chemotherapeutic drugs with an in vitro test. J Natl Cancer Inst. 1961; 27: 807-815.

DOLBEARE FA, GRATZNER H, PALLAVICINI MG, GRAY JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80: 5573-5577.

DONATSCH P, ABISCH E, HOMBERGER M, et al. A radioimmunoassay to measure ciclosporin A in plasma and serum samples. J Immunoassay. 1981; 2: 19-32.

DRUGGE R, HANDSCHUMACHER R. Cyclosporine: mechanism of action. In Kahan B, ed. Cyclosporine: Nature of the agent and its immunologic actions. Ed. Grune & Sttraton. New York. 1988; p. 301-309.

DURETTE PL, BOGER J, DUMONT F, et al. A study of the correlation between cyclophilin binding and in vitro immunosuppressive activity of cyclosporine A and analogues. Transplant Proc. 1988; 20 (Suppl 2): 51-57.

DURIE BGM, YOUNG LA, SALMON SE. Human myeloma in vitro colony growth: Interrelationship between drug sensitivity, cell kinetic, and patients survival duration. Blood. 1983; 61: 929-934.

DURKIN WJ, GHANTA VK, BALCH CM, DORRIS DW, HUMAMOTO RN. A methodoiogical approach to the prediction of anticancer drug effects in humans. Cancer Res. 1979; 39: 402-407.

DYKES P, BRUNT J, MARKS R. Effect od cyclosporin on human epidermal cells in vitro. J. Invest Dermatol. 1989; 92: 423. Abstract.

EFFERTH T, LOHRKE H, VOLM M. Correlations between natural resistance to doxorubicin, proliferative activity, and expression of P-glycoprotein 170 in human kidney tumor cell lines. Urological Research. 1990: 309-312.

EISENBERG D, SCHWARZ E, KOMAROMY M, WALL R. Analysis of membrane and surface protein sequences with a hydrophobic moment plot. J Mol Biol. 1989; 179: 125-142.

ELDER J, GUPTA A, FISHER G, VOOR HEES J. Cyclosporine inhibits ornithine decarboxylase gene expression and acute inflammation in response to phorbol-ester treatment of hairless mouse skin. In Kahan B. Cyclosporine: Application in autoimmune diseases. Ed. Grune & Stratton. New York. 1988; p. 95-104.

ELLIS C, GORSULOWSKY D, HAMILTON T, et al. Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. JAMA. 1986; 256: 3110-3116.

ELLISON DJ, NATHWANI BN, METTER GE, et al. Mitotic counts in follicular lymphomas. Hum. Pathol. 1987; 18: 502-505.

ENGEL LW, YOUNG NA. Human breast carcinoma cells in continous culture: a review. Cancer Res. 1978; 38: 4327-4339.

EXTON JH. Calcium signalling in cells-mollecular mechanisms. Kidney Int. 1987; 32(suppl.23): S68-S76.

FAIRCHILD CR, IVY SP, RUSHMORE T, et al. Careinogen-induced MDR overexpiession is associated with xenobiotic resistance in rat preneoplastic liver nodules and hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 7701-7705.

FAIRLEY J, FUNG P, EWING N. Calmodulin content of keratinocytes in vitro: effect of proliferation and cyclosporin A. J Invest Dermatol. 1989; 92: 426. Abstract.

FAN T, LEWIS G. Mechanism of cyclosporine A-induced inhibition of prostaglandine synthesis by macrophaes. Prostaglandins. 1985; 30: 735-740.

FANDEEV L, ARTEMEVA E, SERDUYKOVA G. Chlorpromazine therapy for psoriasis. Sb Nauch Rab Ro Leprol Dermatol. 1961; 15: 127-133.

FAYNOR SM, MOYER TP, STERIOFF S. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. Mayo Clinic Proc. 1984; 59: 571-572.

FERRER-ROCA O. Análisis de imagen (1). Principios básicos de tratamiento y evaluación estadística. Ed Conf Cajas de Ahorro S/C Tfe. 1986; 54-57.

FERRER-ROCA O, BALLESTER E, FERNANDEZ E. Clasificación automática en anatomía patológica. Experiencia en patología tiroidea y en linfomas de alto grado de malignidad. Patología. 1988a; 21: 195-200.

FERRER-ROCA O, BALLESTER E, MARIN J, GOMEZ R, MAYORA K. Nuclear chromatin linear texture to differenciate follicular and papillary carcinomata of the thyroid. Pathol Res and Pract. 1988b; p. 157-163.

FERRER-ROCA O. Olga'Scan. Software de análisis textural con aplicaciones citológicas. Receptores estrogénicos. En: Ferrer-Roca O. Análisis de imagen (II). Universidad de la Laguna. 1989: 43-53.

FERRER-ROCA O. Texcan software de análisis textural con aplicaciones citológicas. En: Ferrer-Roca O. Análisis de Imagen (II) Aplicaciones. Universidad de la Laguna. 1990: 81-117.

FEULGEN R, ROSSENBECK H. Mikroskopisch-chemister nachweis einer nuklei-säure vom typus der thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen präparaten. Z Physiol Chem. 1924; 135: 203-224.

FIDELUS R, LAUGHTER A, TWOMEY J, TAFFET S, HADDOX M. The effect of cyclosporine on ornitine decarboxylase induction with mitogens, antigens and lymphokines. Transplantation. 1984; 37: 383-397.

FIDLER IJ, HART IR. Biologic diversity in metastatic neoplasm: Origin and implication. Science. 1962; 217: 998-1003.

FIGUEREDO A, ARNOLD A, GOODYEAR M, et al. Addition of verapamil and tamoxifen to the initial chemotherapy of small cell lung cancer. Cancer. 1990; 65: 1895-1902.

FOJO AT, AKIYAMA SI, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. 1985; Cancer Res; 45: 3002-3007.

FOXWELL B, HIESTAND P, WENGER R, RYFFEL B. A comparison of cyclosporine binding by cyclophilin and calmodulin and the identification of a novel 45 KD cyclosporine-binding phosphoptrotein in jurkat cells. Transplantation. 1988; 46, Suppl. 2: 35-40.

FREED BM, ROSANO TG, LEMPERT N. In vitro immunosuppressive properties of cyclosporine metabolites. Transplantation. 1987; 43: 123-127.

FREEMAN H. On the encoding of arbitrary geometric configurations IEEE. Trans Elect Computers EC-10. 1961; p. 260-268

FRESHNEY RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc. (Eds.) New York. 1983; p. 119-128.

FRESHNEY RI. Animal cell culture. A practical approach series. IRL Press, Oxford. 1986; p. 125-139.

FU YS, REAGAN JW, RICHART RM. Definiton of precursor. Gynecol Oncol. 1981; 12: 220-231.

FU YS, HALL TL, BEREK JS, et al. Prognostic significance of DNA ploidy and morphometric analyses of adenocarcinoma of the uterine cervix. Anal Quant Cytol Histol. 1987; 9: 17-24.

FURUE M, GASPARI A, KATZ S. The effect of cyclosporin A on epidermal cells, II: Cyclosporin A inhibits proliferation of normal and transformed keratinocytes. J Invest Dermatol. 1988; 90: 796-800.

GARCIA DEL MORAL R, GOMEZ MORALES M, QUESADA MJ, et al. Determinación inmunohistoquímica intratisular de ciclosporina A y glicoproteína P-170 en la biopsia renal postransplante: una nueva aproximación diagnóstica a la nefrotoxicidad inducida por este fármaco. Nefrología. 1991; 11 (Supl. 2): 94. Abstract.

GARCIA DEL MORAL R, O'VALLE F. Técnicas de Análisis de imagen en morfología microscópica. En: G. del Moral R, O'Valle F, Rodriguez MD, Quesada MJ. Manual de Histotecnología. Ed. Interamericana. Granada. 1992, en prensa.

GAZNARD AF, CARNEY DN, RUSSELL EK, et al. Small cell carcinoma of the lung: establishment of continuous, clonable cell lines having APUD properties. Cancer Res. 1980; 40: 3502-3507.

GELFAND E, CHEUNG R, MILLS G. The cyclosporins inhibit lymphocyte activation at more than one site. J Immunology. 1987; 138: 1115-1120.

GEORGES E, BRADLEY G, GARIEPY J. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 152-156.

GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, STEIN H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer. 1983; 31: 13-20.

GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER HH, SCHWAB U, STEIN H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.J. Immunol. 1984; 133: 1710-1715.

GERDES J, LI L, SCHLUETER C, DUCHROW M, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am. J. Pathol. 1991; 138: 867-873.

GERLACH JH, BELL DR, KARAKOUSIS C, et al. P-Glycoprotein in human sarcoma: evidence for multidrug resistance. J Clin Oncol. 1987; 5: 1452-1460.

GERVASONI JE, FIELDS SZ, KRISHNA S, et al. Subcellular distribution of Daunorubicin in P-glycoprotein-positive and -negative drug-resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy. Cancer Research. 1991; 51: 4955-4963.

GEY GO, COFFMAN WD, KUBICEK MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer. 1952; 12: 364-365.

GIARETTI W, GAIS P, JUTTING U, RODENACKER K, DORMER P. Correlation between chromatin morphology as derived by digital image analysis and autoradiographic labeling pattern. Anal Quant Cytol. 1983; 5: 79-89.

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.

GOLDSTEIN LJ, FOJO A, UEDA K, et al. Expression of the multidrug resistance MDR1 gene in neuroblastomas. J Clin Oncol. 1990; 8: 128-136.

GONZALEZ RG, WINTZ P. Digital image processing CH8. Representation and description. In: Gelsema ES and Kanal LN. Pattern recognition in practice II. Ed. Elsevier Science Publis. 1986: p. 398-402.

GONZALEZ R, WINTZ P. Digital image processing, 2nd edition Addison-Wesley Publishing Company, TA. 1987; p. 144-160.

GOPPINGER A, FREUDENBERG N, ROSS A, et al. The prognostic significance of the DNA distribution in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Anal Quant Cytol Histol. 1986; 8: 148-151.

GORGOJO L, RUIZ DE ALMODÓVAR M, VILLALBA J, SORIANO L, OLEA N, PEDRAZA V. Cultivos celulares en Oncología: Ensayos de radio y quimiosensibilidad. Oncología. 1991; 14(4): 213-219.

GOTTESMAN MM, PASTAN I. The multidrug transporter, a double-edged sword. J. Biol. Chem. 1988a; 263: 12163-12166.

GOTTESMAN MM, PASTAN I. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. Tips Reviews. 1988b; 91: 54-57.

GOTTESMAN M, PASTAN I. Mechanisms and functions of the multidrug transporter (Abstract). Proc Am Ass Cancer Res. 1990; 31: 517-518.

GRANELLI-PIPERNO A, INABA K, STEINMAN RM. Stimulation of lymphokine release from T-lymphoblasts. J Exp Med. 1984; 160: 1792-1802.

GRANELLI-PIPERNO A, ANDRUS L, STEINMAN RM. Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human T cells: kinetics, mitogen requirements and effects of cyclosporin A. Journal of experimental medicine. 1987; 163: 922-937.

GRATZNER HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo- deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science. 1982; 218: 474-475.

GREVEL J, NUESCH E, ABISCH E, KUTZ K. Pharmacokinetics of oral Cyclosporine A (Sandimmun) in healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol. 1986; 31: 211-216.

GREVEL J. Significance of cyclosporine pharmacokinetics. Transplant. Proc. 1988; 20: 428-434.

GROGAN T, DALTON W, RIBSKI J, et al. Optimization of immunocytochemical P-glycoprotein assessment in multidrug-resistant plasma cell myeloma using three antibodies. Lab Invest. 1990; 63: 815-824.

GROSS P, CROOP J, HOUSMAN D. Mamalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. Cell. 1986; 47: 371-380.

GROSS P, RAYMOND JB, HOUSMAN D. Clonning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family. Moll Cell Biol. 1988; 8: 2770-2778.

GROSSHANS E, HENRY M, TELL G, et al. Les polyamines dans le psoriasis. Ann Dermatol Venereol. 1980; 107: 377-387.

GSCHWENDT M, KITTSTEIN W, HORN F, MARKS F. Cyclosporin A inhibits biological effects of tumor-promoting phorbol-esters. Biochem Biophys Res Commun. 1985; 16: 327-332.

GSCHWENDT M, KITTSTEIN W, MARKS F. Cyclosporin A inhibits phorbolester-induced cellular proliferation and tumor promotion as well as phosphorylation of a 100 KD protein in mouse epidermis. Carcinogenesis. 1987; 8: 203-207.

GSCHWENDT M, KITTSTEIN W, MARKS F. The meek immunosuppressant cyclosporine D as well as the immunologically inactive cyclosporine H are potent inhibitors in vivo of phorbol-ester TPA-induced biological effects in mouse skin and Ca^{++}/calmodulin-dependent EF-2 phosphorylation in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1988; 150: 545-551.

GUAZZI A, BOZETTI C, RIVA I, et al. Relationship between estrogen receptor concentration and cytomorphometry in breast cancer. Cancer. 1985; 56: 1972-1976.

GURECKI J, WARTY V, SANGHVI A. The transport of cyclosporine in association with plasma lipoproteins in heart and liver transplant patients. Transplant Proc. 1985; Vol XVII, No 4: 1997-2002.

HAIT WM, STEIN JM, KOLETSKY AJ, HARDING MW, HANDSCHUMACHER RE. Activity of cyclosporin A and a non-immunosuppresive cyclosporin against multidrug resistant leukemic cell lines. Cancer Commun. 1989; 1: 35-43.

HAMADA H, TSURUO T. Funtional role of 170.000-180.000 dalton glycoprotein specific for drug-resistant tumors cells as revealed by monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83: 7785-7795.

HAMBURGER WS, SALMON SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science. 1977; 461-463.

HAMBURGER AW. Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. JNCI. 1981; 66:981-988.

HANDSCHUMACHER RE, HARDING M, RICE J, DRUGGE R. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. Science. 1984; 226: 544-547.

HANDSCHUMACHER RE. Agentes inmunosupresores. En: Goodman A, Rall T, Nies A, Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapeútica. Ed. Medica Panamericana. Mexico, 1991; 1223-1235.

HANNINK M, DONOGHUE D. Lysine residue 121 in the proposed ATP-binding site of the v-mos protein is required for transformation. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 7894-7898.

HARDING M, HANDSCHUMACHER RE. Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Transplantation. 1988; 46: 29S-35S.

HARMS H, GUNZER U, AUSH M. Combined local color and texture analysis of stained cells. Comp Visgraph Imag Proc. 1986; 33: 364-376.

HARNETT JD, PARFREY PS, PAUL MD, et al. Erythromocin cyclosporine interaction in renal transplant recipients. Transplantation. 1987; 43: 316-318.

HARRIS J, KITTLER J, LLEWELLYN B, PRESTON GA. Modular system for interpreting binary pixel representations of line structured data. Pattern Recog Theory and Applic. 1982: 311-351.

HELDERMAN J, SAGALOWSKY A, DAWIDSON I, et al. Cy A rescue: Salvage of renal transplants under-going acute rejection unresponsive to convencional treatment. Abstract. Kidney Int. 1985; 27: 342. Abstract.

HELIN HJ, EDGINGTON TS. Cyclosporine A regulates monocyte/macrophage effector functions by affecting instructor T cells: inhibition of monocyte procoagulant response to allogenic simulation. J. Immunol. 1984; 132: 1074-1076.

HEO DS, PARK JG, HATA K, DAY R, HERBERMAN RB, WHITESIDE TL. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. Cancer Res. 1990; 50: 3681-3690.

HEROLD KC, LANCKI DW, MOLDWIN RL, FITCH FW. Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T Cells. J. Immunol.. 1986; 136: 1315-1321.

HERWEIJER H, SONNVFLD P, BAAS F, NOOTER K. Expression of mdr1 and mdr3 multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and association with stimulation of drug accumulation by cyclosporine. J Natl Cancer Inst. 1990; 82: 1133-1140.

HESS AD, TUTSCHKA PJ. Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. J Immunol. 1980; 124: 2601-2608.

HESS AD, TUTSCHKA PJ, SANTOS GW. Effect of cyclosporine A on human lymphocyte responses in vitro. III. CsA inhibits the production of T lymphocyte growth factors in secondary mixed lymphocyte responses but does not inhibit the response of primed lymphocytes to TCGF. J Immunol. 1982; 128: 355-359.

HESS AD, HORWITZ L, BESCHORNER WE, SANTOS GW. Development of graft-vs-host disease-like syndrome in cyclosporine-treated rats after syngeneic bone marrow transplantation I. Development of cytotoxic T lymphocytes with apparent policlonal anti-Ia specifity including autoreactivity. J Exp Med. 1985; 161: 718-730.

HESS AD, COLOMBANI PM. Inverse correlation of cyclosporin binding with sensitivity and resistance. Transplantation. 1988; 46: 61S-67S.

HESS AD, ESA A, COLOMBANI D. Mechanisms of action of cyclosporie: effect on cells of the immmune sustem and on subcellular events in T cell activation. Transplant Procc. 1988; 20 (suppl.2): 29-40.

HIEBERT RD. Light sources, detectors,and flow chambers. In: Melamed MR, Mullaney PF, and Mendelsohn ML, eds. Flow cytometry and sorting. New York: Wiley. 1979; 623-637.

HOLLENBERG M. Receptor trigering and receptor regulation: Structure-activity relationshisps from the receptor's poin of view. J. Med. Chem. 1990; 33: 1275-1281.

HOLMES JL, LITTLE JM. Tissue culture microtest for predicting response of human cancer to chemotherapy. Lancet. 1974; 2: 982-987.

HOLT DW, MARSDEN JT, JOHNSTON A, BEWICK M, TAUBE DH. Blood cyclosporin concentrations and renal allograft dysfunction. Br Med. J. 1986; 293: 1057-1059.

HORWITZ KB, ZAVA DT, THILAGAR AK, et al. Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines. Cancer Res. 1978; 38: 2434-2437.

HOWS J, PALMER S, GORDON-SMITH E. Use of cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. Transplantation. 1982; 33: 382-386.

HSU TC. The future of animals, cells, models, and systems in research development, education and testing. Washington DC: Nati Acad Sci. 1977; p. 427-442.

HSU V, HEALD S, HARDING M, HANDSCHUMACHER R, et al. Structural elements pertinent to the interaction of cyclosporin A with its specific receptor protein, cyclophilin. Bochemical Pharmacology. 1990; 40: 131-140.

HU X, MARTIN T, BELL D, et al. Combined use of cyclosporin A and verapamil in modulating multidrug resistance in human leukemia cell lines. Cancer Research. 1990; 50: 2953-2957.

HUANG WY, LIPSEY AI, CHENG MH. Comparison of cyclosporine determinations in whole blood by three different methods HPLC, ^{125}I RIA and ^{3}H RIA. Am. J. Clin. Pathol. 1987; 87: 528-532.

HUMBERT P, RENAUD A, AGACHE P. Calmodulin inhibitor therapy in psoriasis. Arch Dermatol. 1986; 122: 856-857.

HURLEY J, YOUNG L. Selection of anticancer drugs for palliation using tissue culture sensitivity studies.Am. J. Surg. 1965; 109: 39-42.

ISELL BF, CATINO JJ, BVRADLEY ED. Usefulness of the human tumor colony forming assay for new drug development. In: Hoffman V, Berens ME, Martz G, eds. Predictive drug testing on human tumor cells. New York: Springer-Verlag.Ed.. 1984: 237-244.

JONES HW, McKUSICK VA, HARPER PS, WUU KD. The HeLa cell and a reappraisal of its origin. Obstet Gynecol. 1971; 38 (6): 945-949.

JONES SE, DEAN JC, YOUNG LA, et al. The clinical usefulness of the human tumor clonogenic assay (HTCA) in breast cancer. In: Salmon SE, Trent JM. Human tumor cloning. Ed. Grune & Stratton. Tucson. 1984: p. 557-561.

JONGSMA A, SPENGLER B, VAN DER BLIEK A, et al. Chromosomal localization of three genes coamplified in the multidrug-resistant CHrC5 chinese hamster ovary cell line. Cancer Research. 1987; 47: 2875-2878.

JULIANO RL, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochem Biophys Acta. 1976; 455: 152-162.

KACHEL V, MENKE E. Hydrodinamic properties of flow cytometric instruments. In: Melamed MR, Mullaney PF, and Mendelsohn ML. Flow cytometry and sorting. Ed. Wiley. New York. 1979; p. 41-58.

KAHAN BD, RIED M, NEWBERGER J. Pharmacokinetics of cyclosporine in human renal transplantation. Transplant. Proc. 1983; 15: 446-453.

KAHAN BD. Cyclosporine: a powerful addition to the immunosuppressive armamentarium. Am J Kidney Dis. 1984; 3: 444-445.

KAHAN BD, WIDEMAN CA, RIED M, et al. The value of serial serum through cyclosporine levels in human renal transplantation. Transplant Proc. 1984; 16: 1195-1199.

KAHAN BD, PELLIS NR, LEINIKKI P, YOSHIMURA N, SCHREIBER RD. Pharmacodynamic assays of the immunosuppressive action of cyclosporine therapy in transplant recipients. Transplant Proc. 1987; Vol XIX, No 1: 1695-1698.

KAHAN BD, BACH JF. Proceedings of the Second International Congress on cyclosporine. Transplant. Proc. 1988; 20 Suppl. 3: 1-1131.

KAHAN BD, GREVEL J. Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. Transplantation. 1988; 46: 631-644.

KAHAN BD. Drug therapy: cyclosporine. N Engl J Med. 1989a; 321: 1725-1738.

KAHAN BD. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. Transplant Proc. 1989b; Vol XXI, No 3, Suppl 1: 9-15.

KAMEL OW, FRANKLIN WA, RINGUS JC, MEYER JS. Thymidine labelling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. Am. J. Pathol. 1989; 134: 107-113.

KANITAKIS J, ROCHE P, THIVOLET J. The expression of PNA-lectin binding sites and S-100 protein in histiocytic lesions of the skin. A comparative immunohistochemical study. Acta Derm. Venereol (Stockh). 1988; 68: 1-7.

KANITAKIS J, URABE A, HAFTEK M, THIVOLET J. In vivo effects of cyclosporin A on proliferation -and differentiation- associated antigens of human skin. J. Invest Dermatol. 1989; 92: 456. Abstract.

KANITAKIS J, RAMIREZ-BOSCA A, HAFTEK M, THIVOLET J. Histologic light- and electron-microscopic effects of cyclosporin A on normal human skin xenografted onto nude mice. Virchows Arch [A]. 1990; 416: 505-511.

KANITATIS J, THIVOLET J. Cyclosporine. An immunosuppressant affecting epitelial ceil proliferation. Arch Dermatol. 1990; 126: 369-375.

KARTNER N, EVERNDEN-PORELLE D, BRADLEY G, LING V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. Nature. 1985; 316: 820-823.

KATO N, HALPRIN K, TAYLOR J, OHKAWARA A. Cyclosporin A-induced augmentation of the beta-adrenergic adenylate cyclase response of pig epidermis. Arch Dermatol Res. 1988; 280: 89-92.

KAY JE, BENZIE CR. Rapid loss of sensivity of mitogen-induced lymphocyte activation to inhibition by ciclosporin A. Cell. Immunol. 1984; 87: 217-224.

KEIZER HG, SCHUURHUIS GJ, BROXTERMAN HJ, et al. Correlation of multidrug resistance with decreased drug accumulation, altered subcellular drug distribution, and increased P-glycoprotein expression in cultured SW-1573 human lung tumor cells. Cancer Res. 1989; 49: 2988-2993.

KEOWN PA. Therapeutic monitoring of cyclosporin by Sandoz's RIA, cyclotrac and Tdx methods. Transplantation and Immunology (letter). 1988; 5: 8.

KEOWN PA, STILLER CR. Ciclosporina: una espada de doble filo. 1988. Hospital Practice (Ed. Español); Vol. 3, Núm. 1: 51-65.

KERMANI-ARAB V, SALEHMOGHADDAM S, DANOVITCH, HIRJI K, REZAI A. Mediation of the antiproliferative effect of cyclosporine on human lymphocytes by blockade of interleukin 2 biosynthesis. Transplantation. 1985; 39: 439-442.

KHANDKE L, KRANE JF, ASHINOFF R, et al. Cyclosporine in psoriasis treatment. Inhibition of keratinocyte cell-cycle progression in G_1 independent of effects on transforming growth factor α/epidermal growth factor receptor pathways. Arch. Dermatol. 1991; Vol. 127: 1172-1179.

KIMBALL P, GAMAZ N, SELL S. Two episodes of calcium uptake associated with T-lymphocyte activation. Cell Immunol. 1988; 113: 107-116.

KIMBALL P, SELL S. Cyclosporin immunosuppression mediated by calcium/sodium imbalance. Cancer Research. 1989; 49: 877-882.

KIMBALL P, KERMAN R, KKAHAN B. Failure of propyl-peptidyl isomerase to mediate cyclosporine suppression of intralellular activation signal generation. Transplantation. 1991; 51: 509-513.

KLAUS G, HAWRYLOWICZ CM. Activation and proliferation signals in mouse B cells. II Evidence for activation (G0 to G1) signals differing in sensitivity to cyclosporine. Eur J Immunol. 1984; 14: 250-254.

KLAUS G, CHISHOLM P. Does cyclosporin act in vivo as it does in vitro?. Immunol Today. 1986; 7: 101-103.

KLINTMALON G, SAWE J. High dose methylprednisolone increases plasma cyclosporin levels in renal transplant recipients. Lancet.(letter). 1984; 1: 731.

KOHLHAW K, WONIGEIT K, FREI U, et al. Effect the calcium channel blocker diltiazem on cyclosporin A blood levels and dose requirements. Transplant Proc. 1988; 20: 572-574.

KOLETSKY A, HARDING M, HANDSCHUMACHER R. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. J Immunology. 1986; 137: 1054-1059.

KONIG A, BRUCKNER-TUDERMAN L. Epithelial-mesenchymal interactions enhance expression of collagen VII in vitro. J Invest Dermatol. 1991; 96: 803-808.

KOPF AW, GROSS DF, ROGERS GS, et al. Prognostic index for malignant melanoma. Cancer. 1987; 59: 1236-1241.

KOPONEN M, GRIEDER A, LOOR F. The effects of cyclosporins on the cell cycle of T-lymphoid cell lines. Exp Cell Res. 1982;140: 237-250.

KOVACS E. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. Immunol Today. 1991; 12: 17-23.

KREIS W, SORICELLI A. Cyclosporins: Immunosuppressive agents with antitumor activity. Experientia. 1979; 35: 1506-1507.

KRISTENSEN M, PALUDAN K, LARSEN C, ZACHARIAE CO, et al. Quantitative detemination of IL-1 alpha-induced IL-8 mRNA levels in cultured human keratinocytes, dermal fibroblasts, endothelial cells, and monocytes. J Invest Dermatol. 1991; 97: 506-510.

KULLINGER B, WOLFRAM J, HAMILTON G, et al. Pharmacokinetics and metabolism of cyclosporine A in 19 hemodialysis patients. Transplant. Proc. 1990; Vol 22, No. 4: 1702-1705.

KUNZE K, HERRMAN W, MEYER W. The ZYPAB image-processing system for cytologic prescreening for cervical cancer. Anal Quant Cytol. 1980; 2: 252-256.

LARSSON R, NYGREN P. Pharmacological modification of multi-drug resistance (MDR) in vitro detected by a novel fluorometric microculture cytotoxicity assay. Reversal of resistance and selective cytotoxic actions of cyclosporin A and verapamil on MDR leukemia T-cells. Int J Cancer. 1990; 46: 67-72.

LATHAN B, EDWARDS DP, DRESSLER LG, VON HOFF DD, McGUIRE WL. Immunological detection of chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance phenotype. Cancer Research. 1985; 45: 5064-5069.

LEAPMAN S, STONG D, FILO D, SMITH E, BRANDT G. Cyclosporin A prevents the appearance of cell surface 'activation' antigens. Transplantation. 1982; 34: 94-95.

LE BIGOT JF, LAVEWE D, KIECHEL JR. Pharmacocinétique et métabolisme de la CyA. Interactions medicamenteuses. Nephrologie. 1987; 8: 136-141.

LE GRUE S, TURNER R, WEISBRODT N, DEDMAN J. Does the binding of cyclosporine to calmodulin result in immunosuppression?. Science. 1986; 234: 68-71.

LEE BR, HASEMAN DB, REYNOLDS CP. A digital microscopy system for rare-event detection using fluorescent probes. Cytometry. 1989; 10: 256-262.

LELE P, PETERSON P, YANG S et al. Cyclosporine and tegretol another drug interaction (abstracted). Kidney Intern. 1983; 27: 334.

LEMAIRE M, TILLEMENT JP. Cyclosporine pharmacokinetics. J Pharm Pharmacol. 1982; 34: 715-718.

LEMONTT JF, AZZARIA M, GROS P. Increased mdr gene expression and decreased drug accumulation in multidrug-resistant human melanoma cells. Cancer Research. 1988; 48: 6348-6353.

LENSMEYER GL, WIEBE DA, CARLSON IH. Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography.1: Purification of analytical standards and optimization of the assay. Clin. Chem. 1987; 33: 1841-1850.

LEONG ASY, GILHAM P. Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanocytic nevi. Hum Pathol. 1989; 20: 257-262.

LICKISS JN, CANE RA, BARKIE AG. In vitro selection in antineoplastic chemotherapy. Eur. J. Cancer. 1974; 10: 809-814.

LILLEHOJF HE, MALEK TR, SHEVACH EM. Differential effect of cyclosporine A on the expression of T and bera lymphocyte activation antigens. J Immunol. 1984; 133: 244-250.

LINCKE C, VAN DER BLIEK, , SCHUURHUIS G, et al. Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type mdr-1 complementary DNA. Cancer Research. 1990; 50: 1779-1785.

LITHELL H, ODLIND B, SELINUS I, LINDBERG A, LINDSTROM B, FRODIN L. Is the plasma lipoprotein pattern of importance for treatment with cyclosporine?. Transp. Proc. 1986; Vol.XVIII, No 1: 50-51.

LITTLE RG, EBERTOWSKI LA, DAVID CS. Cyclosporine A inhibition of alloantigen presentation. Transplant Proc. 1991; 23 Suppl 2: 6-9.

LORBER MI, PAUL K, HARDING MW, HANDSCHUMACHER RE, MARKS WH. Cyclophilin binding: A receptor-mediated approach to monitoring cyclosporine immunosuppressive activity following organ transplantation. Transplant Proc. 1990; 22: 1240-1244.

LOWE N, BREEDING J, RUSSEL L Cutaneous polyamines in psoriasis. Br J. Dermatol. 1982; 107: 21-26.

LUCIA M, WOAN M, SCHWEIZER R, KOSCIOL C, JOHNSON R, SHARPE R. Cyclosporine inhibits the proliferation of squamous cells. FASEB J. 1986; 45: 272. Abstract.

LUDWINC R, ALBERTS DS, MILLER TP, et al. Evaluation of anticancer drug schedule dependency using an in vitro human tumor clonogenic assay. Cancer Chemother Pharmacol. 1984; 12: 135-141.

MAHONEY WC, ORR JW. Derivatives of ciclosporin compatible with antibody based assay 1: The generation of [^{125}I] labeled cyclosporin. Clin Chem. 1985; 31: 459-462.

MANN BD, KERN DH, GIULIANO AE, et al. Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. Arch Surg. 1982; 117: 33-36.

MARCHISIO P, CANCEDDA R, DE LUCA M. Structural and functional studies of integrin receptors in cultured human keratinocites. Cell Differ Dev. 1990; 32: 355-359.

MARCHISIO P, BONDANZA S, CREMONA O, CANCEDDA R, et al. Polarized expression of integrin receptors (alpha 6 beta 4, alpha 2 beta 1, alpha 3 beta 1, and alpha v beta 5) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes. Cell Biol. 1991; 112: 761-773.

MARX JL Drug resistance of cancer cells probed. Science. 1986; 234: 818-820.

MATTFELDT T, NEUROHR W, MUFLLER A, et al. Stereologic correlates of steroid receptor concentration in invasive ductal breast cancer. Anal Quant Cytol Histol. 1985; 7: 310-314.

MAURER G. Metabolism of cyclosporine. Transplant. Proc.. 1985, 17, Suppl. 1: 19-26.

MAURER G, MAIRE M. Biotransformation and distribution in blood of cyclosporine and its metabolites. Transplant. Proc.. 1986; 18, Suppl. 5: 25-34.

McCLEOD AM, THOMSON AW. FK506: a immunosuppressant for the 1990s. Lancet. 1991; 337: 25-27.

McCREADY RW, PAPADIMITRIOV JM. An analysis of DNA cytophotometry on tissue sections in a rat liver model. Anal Quant Cytol. 1983; 5: 117-123.

McDONALD G, STROUD A, BRUES A, COLE W. In vivo and in vitro assay for drug effect on cancer cells. Ann. Surg. 1963; 157: 785-799.

MEADOR J, SWEET P, STUPECKY M, et al. Enhancement by cyclosporin A of daunorubicin efficacy in Ehrlich ascites carcinoma and murine hepatoma 129. Cancer Research. 1987; 47: 6216-6219.

MENDELSOHN ML. The growth fraction: A new concept applied to tumours. Science. 1963; 132: 1496-1507.

MERKER M, RICE J, SCHWEITZER B, HANDSCHUMACHER RE. Cyclosporin A binding component in BW5147 lymphoblasts and normal lymphoid tissues. Transplant Proc. 1983; 15: 2265-2270.

MEYER-LEHNERT H, SCHIER R. Cyclosporin A enhances vasopressin-induced Ca^{2+} mobilization and contraction in mesangial cells. Kidney Int. 1988; 34: 89-97.

MICKISCH G, KOSSIG J, KEILHAUER G, et al. Effects of calcium antagonists in multidrug resistant primary human renal cell carcinomas. Cancer Research. 1990; 50: 3670-3674.

MIHATSCH MJ, THIEL G, SPICHTIN HP, et al. Morphological findings in kidney transplants after treatment with cyclosporine. Transplant. Proc. 1983; 15: 2821-2835.

MIRAS MT. Análisis de los modelos alternativos a la experimentación animal desde un punto de vista bioquímico. Actas I Jornadas de validación de modelos alternativos "in vitro". 1992; p. 22-27.

MITRA R, VOORHEES J, NICKOLOFF B. Modulation of ^{125}I-EGF ligand binding to cultured keratinicytes. J. Invest Dermatol. 1989; 92: 482. Abstract.

MIYAWAKI T, YACHIE A, OHZEKI S, et al. Cyclosporin A does not prevent expression of Tac antigen, a probable TCGF receptor molecule on mitogen-stimulated human T-cells. J. Immunol. 1983; 130: 2737-2742.

MONKS A, SCUDIERO D, SKELIAN P, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst. 1991; 83: 757-766.

MOORE J, PEATTIE D, FITZGIBBON M, THOMSON J. Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. Nature. 1991; 351: 248-250.

MORALES JM, ANDRES A, PRIETO C, RODICIO JL. Efecto de la eritromicina en los niveles de ciclosporina. Nefrologia. 1987; 7: 199-200.

MORALES JM, OLIET A, PRIETO C, ORTUÑO B. Efecto beneficioso de la interacción ketoconazol-ciclosporina. Nefrología. 1988; 8: 120-125.

MORALES JM, ANDRES A. Inmunosupresión en el trasplante renal. Jano 1991; Vol XLI: 97-133.

MORDOVTSEV VN, STARKOV IV, ZABAROVSKY E, KISSELEV L. Expression of the protooncogenes in psoriatic lesions. Arch Dermatol Res. 1988; 280: 8-11.

MORRIS PJ. Cyclosporine, FK506 ant other drugs in organ transplantation. Current Opinion in immunology. 1991; 3: 748-751.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65: 55-63.

MURAGUCHI A, BUTLER JL, KEHRI JH, FALKOFF RJM, FAUCI AS. Seletive suppression of an early step in human B cell activation by cyclosporin A. J Exp Med. 1983; 158: 690-702.

MUSTO P, CASCAVILLA N, DI RENZO N, et al. Clinical relevance of immunocytochemical detection of muitidrug-resistance-associated P-glycoprotein in hematologic malignancies. Tumori. 1990; 76: 353-359.

MUSTO P, MELILLO L, LOMBARDI G, et al. High risk of early resistant relapse for leukemic patients with presence of multidrug resistance associated P-glycoprotein positive cells in complete remission. Br J Hematol. 1991; 77: 50-53.

NANNEY LB, STOSCHECK CM, MAGID M, KING LE. Altered ^{125}I-epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis. J. Invest Dermatol. 1986; 86: 260-265.

NASHAN B, BLACK J, WONIGEIT K, et al. Effect of the application form of cyclosporine on blood levels: comparison of oral solution and capsules. Transplant Proc. 1988; 20, No. 2: 637-639.

NASSBERGER L, BERGSTRAND A, DEPIERRE JW. An electron and fluorescence microscopic study of LLC-PK$_1$ cells, a kidney epithelial cell line: normal morphology and cyclosporin A- and cremophor-induced alterations. Int Exp Path. 1991; 72: 365-378.

NICCHITTA C, KAMOUN M, WILLIAMSON J. Cyclosporine augments receptor-mediated cellular Ca^{2+} fluxes in isolated hepatocytes. J Biol Chem. 1985; 260: 13613-13618.

NICHOLSON L, WATT F. Decreased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin during treminal dofferentiation of human keratinocytes. J Cell Sci. 1991: 98: 225-232.

NICKOLOFF B, FISHER G, MITRA R, VOORHESS J. Additive and synergistic antiproliferative effets of cyclosporin A and gammainterferon on cultured human keratinocytes. Am J Pathol. 1988; 131: 12-18.

NIEDERBERGER W, LEMAIRE M, MAURER G, NUSSBAUMER K, WAGNER O. Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. Transplant. Proc. 1983; 15: 2419-2421.

NOOTER K, SONNEVELD P, JANSSEN A, et al. Expression of the mdr3 gene in prolymphocytic leukemia: association with cyclosporin A-induced increase in drug accumulation. Int J Cancer. 1990; 45: 626-631.

NOOTER K, HERWEIJER H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. Br J Cancer. 1991; 63: 663-669.

O'GARRA A, WARREN DJ, HOLMAN M, POPHARM A, SANDERSON CJ, KLAUSS GC. Effect of cyclosporine on responses of murine B cells to T cell-derived lymphokines. J Immunol. 1986; 137: 2220

OLEA N, GORGOJO L, VILLALBA J, VILLALOBOS M, RUIZ DE ALMODÓVAR JM, PEDRAZA V. Cultivos celulares en Oncología: bases para su empleo en estudios de hormonosensibilidad. Oncología. 1991; 14(12): 581-587.

OUD PS, HANSELAAR AGJM, PAHLPLATZ MMM, et al. Image derived ploidy pattern analysis for cancer detection and diagnosis: measurements in isolated nuclei from paraffin embedded tissues. Appl Opt. 1987; 26: 3349-3355.

OYER P, STINSON E, JAMIESON S, et al. Cyclosporine in cardiac transplantation: A 2 1/2 year followup. Transplant Proc. 1983; 15 (4, Suppl. 1); 2546-2552.

PAHLPLATZ MMM, KATZKO MW, HESSELMANS GHFM, et al. Two mwthods for analyzing pleural smears for the presence of abnormalities. Pattern Recognition Lett. 1986; 4: 405-411.

PALACIOS R. Concavanalin A triggers T-lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. J Immunol. 1982; 128: 337-342.

PATCHCINSKI RJ, BURCKART GJ, VENKATARAMANAN R. Cyclosporine. Drug Intell Clin Pharm. 1985; 19: 90-100.

PAUL K, HARDING MW, MARKS WH, HANDSCHUMACHER RE, LORBER MI. Cyclophilin binding: A more accurate measure of cyclosporine immunosuppressive activity after renal transplantation. Transplant Proc. 1991; 23, No 1: 974-975.

PEGG AE, CANN PP. Polyamine metabolism and function. Am. Physiol. 1982; 234: C212-C221.

PENN I, FIRST M. Development and incidence of cancer following cyclosporine therapy. Transplant Proc. 1986; 17: 210-213.

PENN I. Cancers following cyclosporine therapy. Transplantation. 1987; 43: 32-35.

PHILLIPS RM, BIBBY MC, DOUBLE JA. A critical appraisal of the predictive value of in vitro chemosensitivity assays. J Natl Cancer Inst. 1990; 82: 1457-1468.

PILERI S, SABATTINI E, FALINI B, et al. Immunohistochemical detection of the multidrug transport protein P-170 in human normal tissues and malignant lymphomas. Histopathology. 1991; 19: 131-140.

PINKEL D, STOREL R. Flow chambers and sample handling. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD, and Melamed M. Flow cytometry: instrumentation and data analysis. Ed. Academic Press. Orlando. 1985; p. 352-387.

PLUMMER-COBB J, WALKER DG, WRIGTH JC. Comparative chemotherapy studies on primary short-term cultures of human normal benign and malignant tumor tissues - a five-year study. Cancer Res. 1961; 21: 583-590.

PRATT W. Digital image processing. NY, John Willey & Sons. 1978: 489-490.

PRESSMAN J. Markovian analysis of cervical cell images. J Histoch Cytoch. 1976; 24. 138-146.

PTACHCINSKI RJ, BURCKART GJ, VENKATARAMANAN R. Cyclosporine. Drug Intell Clin Pharm. 1985a; 19: 90-100.

PTACHCINSKI RJ, VENKATARAMANAN R, ROSENTHAL JT et al. The effect of food on cyclosporine absorption. Transplantation. 1985b; 40: 174-176.

PTACHCINSKI RJ, VENKATARAMANAN R, BURCKART GJ. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. Clin. Pharmacokinetic. 1986; 11; 107-132.

QUESNIAUX V, SCHREIER MH, WENGER RM, et al. Cyclophilin binds to the region of cyclosporine involved in its immunosuppressive activity. Eur. J. Immunol. 1987a; 17: 1359-1365.

QUESNIAUX V, TEES R, SCHREIER MH, et al. Potential of monoclonal antibodies to improve therapeutic monitoring of cyclosporine. Clin. Chem. 1987b; 33: 32-37.

QUESNIAUX V, SCHREIER M, WENGER R. Mollecular characteristics of cyclophilin-cyclosporine interaction. Transplantation. 1988; 46: 23S-27S.

RAMIREZ-BOSCA A, KANITAKIS J, HAFTEK M, FAURE M, CASTELLS RODELLAS A, THIVOLET J. Non-immunosuppressive ciclosporin H inhibits the growth and DNA synthesis of cultured normal human epidermal keratinocytes. Skin Pharmacol. 1989; 2: 175-179.

RAMIREZ-BOSCA A, KANITAKIS J, HAFTEK M, FAURE M, CASTELLS-RODELLAS A, THIVOLET J. Effects of cyclosporin A on cultured human epidermal keratinocytes: growth and 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. Acta Derm Venereol (Stockh). 1990a; 70: 6-10.

RAMIREZ-BOSCA A, KANITAKIS J, THIVOLET J. Cyclosporin A exerts a cytostatic effect in vivo on human and murine epithelial cells. Cancer. 1990b; 66: 936-940.

REDMOND S, JONCOUR F, BUSER K, et al. Assessment of P-glycoprotein, glutathione-based detoxifying enzymes and 06-alkylguanine-DNA alkyltransferase as potential indicators of constitutive drug resistance in human colorectal tumors. Cancer Research. 1991; 51: 2092-2097.

REED JC, NOWELL PC, HOOVER RG. Regulation of c-Myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 4221-4224.

REED JC, ALPERS JD, NOWELL PC, HOOVER RG. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83: 3982-3986.

REEM GH, COOK LA, VILECK J. Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T-lymphocyte inhibited by cyclosporine A. Science. 1983; 221: 63-65.

REYMOND JP. Cyclosporine pharmacokinetics. PhD thesis. University of Basel. Switzerland. 1986.

RICHTER CH, THEUS M, SCHLEGEL J. Cyclosporine A inhibits mitochondrial pyridine nucleotide hydrolysis and calcium release. Biochemical Pharmacology. 1990; 40: 779-782.

RIED M, GIBBONS S, KWOK D, VAN BUREN CT, FLECHNER S, KAHAN D. Cyclosporine levels in human tissues of patients treated for one week to one year. Transplant. Proc. 1983; 15: 2434-2437.

RINGE D. Binding by design. Nature. 1991; 351: 185-186

ROBERTS DW, FOGLESONG PD, PARGANAS E, WIGGINS L. Reduced formation of lesions in the DNA of a multidrug-resistant 11210 subline selected for teniposide resistance. Cancer Chemother Pharmacol. 1989; 23: 161-168.

ROBEY-CAFFERTY S, RUTLEDGE M, BRUNER J. Expression of a multidrug resistance gene in esophageal adenocarcinoma. Am J Clin Pathol. 1990; 93: 1-7.

RODELLAS A, THIVOLET J. Nonimmunosuppressive Cyclosporin H inhibits the growth and DNA synthesis of cultured normal human epidermal keratinocytes. Skin Pharmacol. 1989; 2: 175-179.

RODENHUIS S, McGUIRE JT, NARAYANAN K, et al. Development of an assay system for the detection and classification of methotrexate resistance in fresh human leukemia cells. Cancer Research. 1986; 46: 6513-6519.

RONAN SG, DAS GUPTA TK. Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. Semin. Oncol. 1988; 15: 558-565.

RONINSON I, CHOI K, MORSE B, et al. Molecular biology and diagnosis of multidrug resistance. Proc Am Ass Cancer Res. 1990; 31: 518-519. Abstract.

ROPER P, DREWINKO B. Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. Cancer Res. 1976; 36: 2182-2188.

RORKE E, ECKERT R. Stable expression of transfected human involucrin gene in various cell types: evidence for in situ cross-linking by type I and type II transglutaminase. J Invest Dermatol. 1991; 97: 543-548.

ROSANO TG, FREED BM, PELL MA, LEMPERT N. Cyclosporine metabolites in human blood and renal tissue. Transplant. Proc. 1986; Vol XVIII, No 6, Suppl. 5: 35-40

ROSANO TG, BROOKS CA, DYBAS MP, et al. Selection of an optimal assay method for monitoring cyclosporine therapy. Transplant Proc. 1990; 22: 1125-1128.

ROSENTHAL D, STEINERT P, CHUNG S, et al. A human epidermal differentiation-specific keratin gene is regulated by calcium but not negative modulators of differentiation in transgenic mouse keratinocytes. Cell-Growth-Differ. 1991; 2: 107-113.

ROSOFF P, TERRES G. Cyclosporine A inhibits Ca^{++} dependent stimulation of the Na^{+}/H^{+} antiport in human T cells. J Cell Biol. 1986; 103: 457-463.

RUBINSTEIN LV, SHOEMAKER RH, PAULL KD, et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst. 1990; 82: 1113-1118.

RUSSEL D, LARSON D, CARDON S, COPELAND J. Cyclosporine inhibits prolactin induction of ornitine decarboxylase in rats tissues. Mol. Cell. Endocrinol. 1984; 35: 159-166.

RUTLEDGE M, ROBEY-CAFFERTY S, SILVA E, BRUNER J. Monoclonal antibody (C-219) detection of the multidrug resistant protein (P-glycoprotein) in routinely processed tissue: a study of 36 cases of ovarian carcinoma. Mod Pathol. 1989; 3: 298-301.

RYFFEL B, DONATSCH P, MADORIN M, et al. Toxicological evaluation of cyclosporine A. Arch. Toxicol. 1983; 53: 107-142.

RYFFEL B, HIESTAND P, FOXWELL B, et al. Nephrotoxic and immunosuppressive potentials of cyclosporine metabolites in rats. Transplant. Proc. 1986; 18, Suppl. 5: 41-45.

RYFFEL B, FOXWELL BMJ, MIHATSCH MJ, DONATSCH P, MAURER G. Biological significance of cyclosporine metabolites. Transplant. Proc. 1988; Vol XX, No 2, Suppl 2: 575-584.

SAFA AR, GLOVER CJ, SEWELL JL, MEYERS MB, BRIEDLER JL, FELSTED RL. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. J Biol Chem. 1987; 262: 7884-7890.

SALMON SE, HAMBURGER AW, SOEHNLEN BJ, et al. Quantitation of differential sensitivity ofhuman tumor stem cells to anticancer drugs. N. Engl. J. Med. 1978; p. 1321-1327.

SASAKI K, MURAKAMI T, KAWASAKI M, TAKAHASHI M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive antigen expresion. J. Cell. Physiol. 1987a; 133: 579-584.

SASAKI K, MURAKAMIT, TAKAHASHI M. A rapid and simple estimation of cell cycle parameters by continous labeling with bromodeoxyuridine. Cytometry. 1987b; p. 526-528.

SASAKI K, MATSUMURA K, MURAKAMI T, SHINOZAKI F, TAKAHASHI M. Effects of serum deprivation on Ki-67 reactive antigen. Expresion in HeLa cells. A.Pathol. Jap. 1989; 39: 638-642.

SAYDJARI R, TOWNSEND C, BARRANCO S, JAMES E, THOMPSON J. Effects of cyclosporin A and α-difluoromethylornithine on the growth of hamster pancreatic cancer in vitro. JNCI. 1986a; 77: 1087-1092.

SAYDJARI R, TOWNSEND C, BARRANCO S, THOMPSON J. Effects of cyclosporine and α-difluoromethylornithine on the growth of mouse colon cancer in vitro. Life Sci. 1986b; 40: 359-366.

SCHEULER M, OSIEKA R. Increased activity of Adriamycin against a human testicular cancer xenograft by cyclosporin. Proc Am Asso Cancer Res. 1987; 28: 409. Abstract.

SCHMOECKEL C, BRAUN-FALCO O. Prognostic index in malignant melanoma. Arch. Dermatol. 1978; 114: 871-873.

SCHUURHUIS GJ, BROXTERMAN HJ, PINEDO HM, et al. The polyoxyethylene castor oil Cremophor EL modifies multidrug resistance. Br J Cancer. 1990; 62: 591-594.

SCHWARTZ G, ARKIN H, HOLLAND J, OHNUMA T. Protein kinase C activity and multidrug resistance in MOLT-3 human lymphoblastic leukemia cells resistant to trimetrexate. Cancer Research. 1991; 51: 55-61.

SCOTTO KW, BEIDLER J, MELERA PW. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mamalian cells. Science. 1986; 232: 751-755.

SHAH AK, SAWCHUK RJ. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine and its metabolites in blood. Clin. Chem. 1988; 34: 1467-1471.

SHARPE R, ARNDT K, BAUER S, MAIONE T. Cyclosporine inhibits basic fibroblast growth factor driven proliferation on human endothelial cells and keratinocytes. Arch. Dermatol. 1989; 125: 1359-1362.

SHAW LM, BOWERS L, DEMERS L, et al. Metabolism of cyclosporine A. Clin. Chem. 1987; 33: 1269-1275.

SHAW LM. Advances in cyclosporine pharmacology, measurement and therapeutic monitoring. Clin. Chem. 1989; 35: 1299-1308.

SHEN DW, PASTAN I, GOTTESMAN MM. In situ hybridization analysis of acquisition and loss of the human multidrug-resistance genes. Cancer Research. 1988; 48: 4334-4339.

SHEPER R, BULTE J, BRAKKE J, et al. Monoclonal antibody JSB-1 detects a highly conserved epitope on the P-glycoprotein associated with multi-drug-resistance. Int J Cancer. 1988; 42: 389-394.

SHEVACH EM. The effects of cyclosporine A on the immune system. Annu. Rev. Immunol. 1985, 3: 397-423.

SHOEMAKER RH, WOLPERT DE FILIPPES MK, MELNICK N. Recent result of new drug screening trials with a human tumor colony forming assay.In: Salmon SE, Trent J. Human tumor cloning. Ed. Grune & Stratton. Tucson. 1984; p. 345-351.

SILVERBERG SG. Reproducibility of the mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumors of the uterus. Hum. Pathol. 1976; 7: 451-454

SILVERMANN M, BOERSMA A, JANSSEN A, et al. Effects of cyclosporin A and verapamil on the intracellular daunorubicin accumulation of Chinese hamster ovary cells with increasing levels of drug-resistance. Int J Cancer. 1989; 44: 722-726.

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst. 1990; 82: 1107-1112.

SKLAREW R, PERTSCHUK L. Quantitation of the immunocytochemical assay for estrogen receptor protein (ER-ICA) in human breast cancer by television imaging. J Histoch Cytoch. 1987; 35: 1253-1259.

SLATER TF, SAWYER B, STRAULI V. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of our different tetrazolium salts. Biochim Biophys Acta. 1963; 77: 383-393.

SLATER LM, SWEET P, STUPECKY M, GUTPA S. Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. J. Clin. Invest. 1986; 77: 1405-1408.

SMEULDERS A, KATE T. Accuracy of optical density measurement of cells. 1: Low resolution. Applied Optics. 1987; 26: 3249-3257.

SMITH AY, CITTERIO F, WELSH M, KERMAN RH, KAHAN BD. Interleukin-2 receptor as an immunodiagnostic tool to differentiate rejection from nephrotoxicity. Transplant Proc. 1989; Vol 21, No 1: 1462-1464.

SMOLLE J, SOYER HP, JUETTNER FM, et al. Nuclear parameters in the superficial and deep portion of melanocytic lesions a morphometrical investigation. Pathol Res Pract. 1988; 183: 266-270.

SONDAK VK, BERTELSEN CA, KERN DH, et al. Evolution and clinical application of a rapid chemosensitivity assay. Cancer. 1985; 55: 1357-1371.

SOULE HD, VAZQUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M. A human cell line from a pleural effusion derived from a brest carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1973; 51: 1409-1416.

STAHELIN H. Cyclosporin A: historical background. Prog Alergy. 1986; 38: 19-27.

STAHL R, KUDELKA S. Chronic cyclosporine A-treatment reduces prostaglandin E2 formation in isolated glomeruli and papilla of rat kidneys. Clin Nephrol. 1986; 25 (Suppl 1): 78S-82S.

STERNBERGER LA, STERNBERGER NH. The unlabeled antibody method: Comparison of Peroxidase-Antiperoxidase with Avidin-Biotin complex by new method of quantification. J Histochem Cytochem. 1986; 34: 599-605.

STEINER G, MAYER G, WOLOSZCZUK W. Estimation of cyclosporin levels using a ciclophilin-binding assay. Biblthca Cardiol. 1988; 43: 46-56.

STEINKAMP JA, STEWART CC, CRISSMAN HD. Three-color fluorescence measurements on single cells excited at three laser wavelenghts. Cytometry. 1982; 2: 226-231.

STEINMANN B, BRUCKNER P, SUPERTI-FURGA A. Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo-indirect evidence for a phisiologic role of peptidyl-prolylcis-trans isomerase. J Biol Chem. 1991a; 266: 1299-1303.

STEINMANN B, SUPERTI-FURGA A, BRUCKNER P. Mechanism of action of FK506 and cyclosporin.(letter). Lancet. 1991b; 337: 439.

STEVEN A, BANCROFT D. Proteins and nucleic acids. En: Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. Bath Press Avon, Great Britain. 1990; 9: 143-152.

STEVEN A, BISHER M, ROOP D, STEINERT P. Biosynthetic pathways of filagrin and loricrin: two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. J Struct Biol. 1990; 104: 150-162

SUGAWARA I, KATAOKA I, MORISHITA Y, et al. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. Cancer Research. 1988; 48: 1926-1929.

SUGIMOTO Y, TSURUO T. DNA-mediated transfer and cloning of human multidrug-resistant gene of adriamycin-resistant myelogenous leukemia K562. Cancer Research. 1987; 47: 2620-2625.

SUTER M, CRAMERI F, SLATTERY J, MILLARD P, et al. Extracellular ATP and some of its analogs induce transient rises in cytosolic free calcium in individual canine keratinocytes. J Invest Dermatol. 1991; 97: 223-229.

TAKAHASHI N, HAYANO T, SUZUKI M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. Nature. 1989; 337: 473-475.

THIEL G, HERMLE M, BRUNNER FP. Acutely impaired renal function during intravenous administration of cyclosporin A, a cremophor side effect. Clin Nephrol. 1986; 25: 40-42.

THORGEIRSSON S, HUBER B, SORRELL S, et al. Expression of the multidrug-resistant gene in hepatocarcinogenesis and regenerating rat liver. Science. 1987; 236: 1120-1122.

THUNNISSEN FBJM, BAAK JPA, DIEGENBACH PC. Fixation induced variations in quantitative nuclear image features in sections. Acta Histochem (Jena). 1981; 68: 218-226.

THUNNISSEN FBJM, DIEGENBACH PC, BAAK JPA, et al. The influence of variations in measuring procedure on quantitative nuclear image features in histologic sections of lung tissue. Anal Quant Cytol Histol. 1988a; 10: 349-354.

THUNNISSEN FBJM, DIEGENBACH PC, DINGEMANS KP, et al. The effect of sampling on quantitative nuclear image features in histological sections of lung carcinomas. Anal Quant Cytol Histol. 1988b; 10: 355-359.

TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Res. 1961; 14: 213-222.

TOFFOLI G, VIEL A, TUMIOTTO L, et al. Pleitropic-resistant phenotype is a multifactorial phenomenon in human colon carcinoma cell lines. Br J Cancer. 1991, 63: 51-56.

TRAEGER J, DUBERNARD J, BOSI E, et al. Cyclosporine in clinical pancreatic transplantation. In Kahan. Cyclosporine: biological activity and clinical applications. Ed. Grune & Stratton. Orlando. Florida. 1984; p. 386-389.

TSURUO T, IIDA H, TSUKAGOSHI S, SAKURI Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia "in vivo" and "in vitro" thrcugh enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Research. 1981; 41: 1967-1972.

TSURUO T, IIDA H, KITATANI Y, YOKOTA K, TSUKAGOSHI S, SAKURI Y. Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular acumulation of vcr and adriamycin in drug resistant tumors cells. Cancer Research. 1984; 44: 4403-4412.

TVEIT KM, FODSTAD O, PIHL A. The usefulness of human tumor cell lines in the study of chemosensitivity. A study of malignant melanomas. Int J Cancer. 1981; 28: 403-408.

TWENTYMAN P, FOX N, WHITE D. Cyclosporin A and its analogues as modifiers of Adriamycin and vincristine resistance in a multidrug reistant human lung cancer cell line. Br J Cancer. 1987; 56: 55-57.

TWENTYMAN P. Modification of cytotoxic drug resistance modification by non-immunosuppressive cyclosporins. Br. J. Cancer. 1988a; 57: 254-258.

TWENTYMAN P. A possible role for cyclosporins in cancer chemotherapy. Anticancer Res.. 1988b; 8: 985-994.

TWENTYMAN P, REEVE JG, KOCH G, WRIGHT KA. Chemosensitation by verapamil and cyclosporin A in mouse tumour cells expressing different levels of P-glycoprotein and CP22. Br J Cancer. 1990; 62: 89-95.

URABE A, KANITAKIS J, THIVOLET J. Cyclosporin A initiates active hair growth in mice. Skin Pharmacol. 1988; 1: 269-271.

URABE A, KANITAKIS J, VIAC J, THIVOLET J. Cyclosporin A inhibits directly in vivo keratinocyte proliferation of living human skin. J. Invest. Dermatol. 1989; 92: 755-757.

UTSINGER PD, YOUNT WJ, FALLON JG, et al. Cytofluorometric analysis of the kinetics of lymphocyte transformations after phytohemagglutinin stimulation: comparison with the kinetics of thymidine incorporation. Blood. 1977; 49: 33-39.

VAN BUREN CT, KERMAN RH, AGOSTINO G, et al. The cellular target of cyclosporin A action in humans. Surgery. 1982; 92: 167-174.

VAN DER BLIEK AM, VAN DER VELDE-KOERTS, LING V, BORST P. Overexpression and amplification of five genes in a multidrug-resistant chinese hamster ovary cell line. Moll Cell Bio. 1986; 6: 1671-1678.

VAN DER BLIEK AM, BAAS F, TEN HOUTE-DE LANGE T, et al. The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced in RNAs in liver. EMBO J. 1987; 6: 3325-333'

VAN DER BLIEK AM, KOOIMAN PM, SCHNEIDER C, et al. Sequence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein. Gene. 1988; 71: 401-411.

VAN ERP P, VAN DE KERKHOF P. Calmodulin levels in psoriasis and other skin disorders. Arch Dermatol Res. 1987; 279: 151-153.

VELTHUIS P, JESSERUN R. Improvement of ichthyosis by cyclosporin. (letter). Lancet. 1985; 1: 335.

VENKATARAMANAN R, PTACHCINSKI RJ, BURCKART GJ, et al. Cyclosporine . Drug Intell Clin Pharm. 1985; 19: 90-100.

VERWOERD NP, BERNINI LF, BONNET J, et al. Somatic cell mutations in humans detected by image analysis of immunofluorescently stained erythrocytes. IN: Clinical cytometry and histology. Burger G, Ploem JS, Goerttler K, (eds) Academic, London. 1987: 465-469.

VINE W, BOWERS LD. Cyclosporine: structure, pharmacokinetics, and therapeutic drug monitoring. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.. 1988; 25: 275-311.

VISTICA DT, SKEHAN P, SCUDIERO D, MONKS A, PITTMAN A, BOYD MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: acritical examination of selected parameters affecting formazan production. Cancer Res. 1991; 51: 2515-2520.

VOLM M, WAYSS K, KAUFMANN M, MATTERN J. Pretherapeutic detection of tumor resistence and the results of tumor chemoterapy. Eur. J. Cancer. 1979; 15: 983-993.

VOLM M, MATTERN J, SAMSEL B. Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase-π in resistant non-small cell lung carcinomas of smokers. Br J Cancer. 1991; 64: 700-704.

VON HOFF DD, CASPER J, BRADLEY E, et al. Association between human tumor-colony forming assay results and response of an individual patients tumor to chemotherapy. Am J Med. 1981; 70: 1027-1032.

VON HOFF DD, CLARK GH, STAYDILL BJ Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. Cancer Res. 1983; 43: 1926-1931.

VON WARTBURG A, TRABER R. Chemistry of the natural cyclosporin metabolites. Prog Allergy. 1986; 38: 28-45.

WADHWA NK, SCHROEDER TJ, O'FLAHERTY E, PESCE AJ, MYRE SA, ROY FIRST M. The effect of oral metoclopramide on the absorption of cyclosporine. Transplantation. 1987; 43: 211-213.

WAGNER K, HENKEL M, HEINEMEYER G, et al. Interaction of calcium blockers and cyclosporine. Transpiant Proc. 1988; 20: 561-568.

WALUM E. Different ways to adress the problem of validating new in vitro toxicological methods. Actas I Jornadas de validación de modelos alternativos "in vitro". 1992; p. 13-15.

WANG CP, BURCKART GJ, PTACHCINSKI RJ, VENKATARAMANAN R, et al. Cyclosporine metabolite concentrations in the blood of liver, heart, kidney and bone marrow transplant patients. Transplant. Proc. 1988; 20: 591-596.

WEINSTEIN GD, FROST P. Abnormal cell proliferation in psoriasis. J. Invest. Dermatol. 1968; 50: 254-260.

WEINSTEIN G, McCULLOUGH J, ROSS P. Cell kinetic basis forpathophysiology of psoriasis. J. Invest Dermatol. 1985; 85: 579-583.

WEINSTEIN R, KUSZAK J, JAKATE S, et al. ABO blood type predicts the cytolocalization of anti-P-glycoprotein monoclonal antibody reactivity in human colon and ureter. Hum Pathol. 1990; 21: 949-958.

WENGER RM. Chemistry of cyclosporine. In: Cyclosporin A. Ed. White, DJD.; Elsenier Biomedical Press, Amsterdam. 1982: 19-26.

WENGER RM. Synthesis of cyclosporine and analogues: structure, activity, relationships of new cyclosporine derivatives. Transplant Proc. 1983; 15: 2230-2241.

WENGER RM. Synthesis of cyclosporin and analogues: structural and conformational requierements for immunosuppressive activity. Prog. Allergy, 1986; 38: 46-64.

WENGER RM. Structures of cyclosporine and its metabolites. Transplantation Proceedings. 1990; 22, Nº3: 1104-1108.

WENK M, FOLLATH F, ABISH E. Temperature dependency of apparent cyclosporine A concentration in plasma.(letter). Clin. Chem. 1983; 29: 1865.

WHEELER T, DENDY P, DAWSON A. Assesment of an in vitro screening test of cytotoxic agents in the treatment of adrenal malignant disease. Oncology. 1974; 30: 362-376.

WHEELES LL, KAY DB. Optics, ligth sources, filters, and optical systems. In: Van Dilla MA, Dean PN, Laerum OD and Melamed MR. Flow cytometry: Instrumentation and data analysis. Ed. Academic Press. Orlando. 1985; p. 145-179.

WHEELES LL. Flow instrumentation and data analys. In: Coon JS and Weinstein RS. Diagnostic flow cytometry. Ed. Willians & Wilkins. Baltimore. 1991; p. 17-34.

WHISLER RL, LINDSEY JA, PROCTOR KVW, NOBUHIRO M, CORNWELL DG. Characteristics of cyclosporine induction of increased prostaglandin levels from human peripheral blood monocytes. Transplantation. 1984; 38: 377-381.

WILLINGHAM M, CORNWELL MM, CARDARELLI CO, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. Cancer Res. 1986; 46: 5941-5946.

WILLINGHAM M, RICHERT N, CORNWELL M, et al. Immunocytochemical localization of P-170 at the plasma membrane of multidrug-resistant human cells. J Histoch Cytoch. 1987; 35: 1451-1456.

WONG R, GUTOWSKI J, KATZ M, GOLDFARB R, et al. Induction of DNA synthesis in isolated nuclei by citoplasmic factors: inhibition by protease inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 241-245.

WONIGEIT K, BROLSCH C, NEUHANS P, et al. Special aspects of immunosuppression with cyclosporine in liver transplantation. In: Kahan BD. Cyclosporine: biological activity and clinical applications. Ed. Grune & Stratton. Orlando. Florida. 1984; p. 370-375.

WOOD AJ, MAURER G, NIEDERBERGER W, BEVERIDGE T. Cyclosporine: Pharmacokinetic, metabolism and drug interactions. Transplant. Proc. 1983; 15: 2409-2412.

WOOD AJ, LEMAIRE M. Pharmacologic aspects of cyclosporine therapy: Pharmacokinetics. Transplant. Proc. 1985; 17, suppl. 1: 27-32.

WRIGHT JC, PLUMMER-COBB J, GUMPORT SL, GOLOMB FM, SAFADI D. Investigation of the relation between clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. N. Engl. J. Med. 1957; 257: 1207-1211.

WRIGHT JC, PLUMMER-COBB J, GUMPORT SL, SAFADI D, WALKER DG, GOLOMB FM. Further investigation of the relation between the clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. Cancer. 1962; 15: 284-293.

WYSOCKY GP, GRETZINGER HA, LAUPACIS A, et al. Fibrosus hyperplasia of the gingiva: a side effect of CsA therapy. Oral Surg. 1983; 55: 274-278.

YARNELL M, AMBROSE EJ, SHEPLEY K, TCHAO R. Drug assays on organ culture of biopsies from human tumours. Br. Ned. J. 1964; 2: 490-491.

YEE GC, KENNEDY MS, GELF SG, et al. Pharmacodynamics of cyclosporine in patients undergoing bone marrow transplantation. Transplant. Proc. 1986; Vol XVIII, No 4: 771-776.

YEE GC, ROSANO T, PTACHCINSKI R. Pharmacology: Profiles, parameters, interpretations, and drug interactions. Trasplant Proc. 1988; Vol XX, No 2: 715-721.

YOSHIMURA N, KAHAN BD. Pharmacodynamic assesment of the in vivo cyclosporine effect on interleukin-2 production by lymphocytes in kidney transplant recipients. Transplantation. 1985; 40: 661-666.

YOSHIMURA N, OKA T, CLARK SC, KAHAN BD. The inhibition of interleukin 2 (IL-2) gene expression at the level of messenger RNA by in vivo cyclosporine treatment in kidney transplant recipients. Transplant Proc. 1987; Vol XIX, No 4: 3510-3512.

YOUNG IT, VERBEEK PW, MAYALL BH. Characterization of chromatin distribution in cell nuclei. Cytometry. 1986; 7: 467-474.

ZEEVI A, EIRAS G, BUREKART G, et al. Immunosuppressive effect of cyclosporine metabolites from human bile on alloreactive T-cells. Transplant. Proc. 1988; 20: 115-121.

ZWELLING I, SLOVAK M, DOROSHOW J, et al. HT1080/DR4: a P- glycoprotein-negative human fibrosarcoma cell line exhibiting resistance to topoisomeraseII-reactive drugs despite the presence of a drug-sensitive topoisomerase II. J Natl Cancer Inst. 1990; 82: 1553-1561.