

GEN MDR-1 y resistencia al Imatinib en células K562

Mabel M. Lardo ¹, Alberto J. Lazarowski ¹, María T. Cuello ², Patricia M. Gargallo ², Michele Bianchini ², Irene B. Larripa ²

F. de ingreso 31/5/07
F. de publicación 15/6/07

1: Depto. Bioq. Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires. Junín 956- Capital

2: Depto de Genética. Instituto de Investigaciones Hematológicas de la
Academia Nacional de Medicina. Pacheco de Melo 3081 Capital



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 11 N° 1: 14-19
Enero - Abril, 2007

RESUMEN

El tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) con Imatinib puede fracasar por mutaciones en el dominio tirosina quinasa o amplificación del gen BCR/ABL. Otros mecanismos de refractariedad pueden deberse a los genes de resistencia múltiple a drogas (MDR). Objetivo: Investigar en la línea celular K562 (LMC resistente al Imatinib), la expresión del gen MDR1 y los efectos de su inhibición con Ciclosporina A (CyA). Métodos: Se sintetizó ADNc por retrotranscripción del ARN total y se amplificaron por RT-PCR los genes BCR/ABL y MDR1 con primers específicos. Se verificó la expresión de la glicoproteína P-gp (producto del gen MDR1) por inmunohistoquímica con 2 anticuerpos monoclonales (C494 y C219). Las células K562 fueron enfrentadas (24hs) con Imatinib (2uM), CyA (3ug/ml), Imatinib+CyA. Se evaluaron apoptosis con naranja de acridina/bromuro de etidio (microscopía de fluorescencia) y función farmacorresistente de P-gp con Rhodamina-123 (citometría de flujo). Resultados: La expresión del gen MDR1 se confirmó tanto por RT-PCR como por inmunohistoquímica. La prueba funcional con Rhodamina-123 indicó que la P-gp fue inhibida por CyA o hipotermia. El tratamiento con Imatinib+CyA triplicó el porcentaje de apoptosis comparado con Imatinib solo.

Conclusión: El gen MDR1 jugaría un rol adicional en la resistencia al Imatinib. La CyA u otros inhibidores de la P-gp, facilitarían la acción del Imatinib, induciendo mayor porcentaje de apoptosis en células BCR/ABL positivas.

INTRODUCCION

En oncohematología se han demostrado numerosas translocaciones cromosómicas que producen la expresión desregulada de numerosas tirosinas quinasa. El ejemplo más típico corresponde a la leucemia mieloide crónica (LMC), caracterizada por el cromosoma Philadelphia (1). Este marcador citogenético resulta de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22

[t(9;22)(q34;q11)], que genera un gen de fusión BCR/ABL responsable de la patogénesis de la enfermedad (2). El reordenamiento molecular BCR/ABL se ha detectado en el 95% de los casos con LMC, en el 25%-30% de las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) del adulto y aproximadamente en 5% de las LLA pediátricas (3).

El punto de ruptura dentro del gen BCR determina 3 diferentes proteínas quiméricas conocidas como p210, p190 y p230, todas ellas con actividad constitutiva de tirosina quinasa (TK). Este aumento de la actividad TK induce múltiples caminos de transducción de señales llevando a un incremento en la proliferación celular independiente de los factores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, y alteración de la adhesión celular al estroma de la médula ósea. La cascada de transducción de señales incluye entre otros a: Ras, MAPK y sus efectores MEK y Erk, PI3K y su efector Akt. (4,5).

Actualmente numerosos estudios han demostrado que la función de tirosina quinasa es necesaria para la actividad transformante. Por lo tanto los agentes terapéuticos inhibidores de proteína quinasa denominados STI (Signal Transduction Inhibitor) constituyen la base racional del tratamiento de las leucemias Philadelphia positivas. El inhibidor de tirosina quinasa, derivado de la 2-fenilaminopirimidina (STI571- Imatinib mesilato) inhibe todas las ABL quinasa (p210, p190, p230, v-abl, c-abl.), como así también otras quinasa: c-Kit, PDGF (Platelet Derived Growth Factor Receptor) y ARG (Abl-Related Gene) (6,7).

La línea celular K562, derivada de un paciente con crisis blástica de una LMC, que expresa el gen BCR/ABL, constituye un modelo ampliamente utilizado en ensayos farmacológicos con Imatinib y otros nuevos inhibidores de TK para el tratamiento de la LMC (8)

Mutaciones en el sitio activo del dominio quinaasa del gen quimérico BCR/ABL, generan resistencia específica al tratamiento con los inhibidores de esta quinaasa, y pueden tornar inefectivo el tratamiento con Imatinib en muchos pacientes, pero aún no se logra explicar el total de casos refractarios en LMC u otras leucemias BCR/ABL positivas (9,10).

El llamado mecanismo de resistencia múltiple a drogas (MDR), se caracteriza por la capacidad de las células neoplásicas de evitar la muerte apoptótica. Uno de los mecanismos de resistencia múltiple drogas, involucra la expresión de una glicoproteína de membrana de 170KDa, denominada P-gp. Esta proteína es un miembro de la familia de los llamados transportadores ABC (ATP binding cassette), y está codificada por el gen MDR1 (multidrug resistance gene o ABCB1). La P-gp tiene la capacidad de transportar fuera de la célula, un amplio espectro de drogas no relacionadas estructuralmente ni funcionalmente, y esta propiedad le permite a la célula neoplásica "resistir" al tratamiento de diferentes fármacos (11,12). Se ha reportado que algunos inmunosupresores tales como la ciclosporina A (CyA) podrían modular la función de la P-gp, inhibiendo su actividad detoxificadora (13,14). De esta forma se lograría la sensibilización de dichas células a la acción de los citotóxicos para los cuales eran inicialmente resistentes.

El desarrollo del llamado fenómeno de resistencia múltiple a drogas, previamente descrito en diferentes tipos de leucemias y tumores, podría entonces estar también presente en la LMC y afectar la eficacia del tratamiento con Imatinib.

Por tal motivo el objetivo de nuestro trabajo fue investigar en la línea K562 resistente al Imatinib, la expresión del gen MDR1 y si la inhibición de la actividad de la P-gp con ciclosporina (CyA), restablece algún nivel de sensibilidad al tratamiento con Imatinib en dicha línea celular.

MATERIAL Y METODOS

Línea Celular: Se usó la línea celular K562 (correspondiente a una Crisis Blástica de una paciente con LMC), con alto nivel de amplificación del gen BCR/ABL y negativo para el gen supresor de tumor p53. Dicha línea celular es a su vez resistente al tratamiento con Imatinib.

Cultivos celulares: Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementadas con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina y gentamicina. Para los ensayos de inducción de apoptosis las células fueron cultivadas por 24 horas a 37°C en estufa gaseada con CO₂ al 5%, con los siguientes tratamientos:

- línea celular sin tratamiento (control);
- línea celular con CyA (Ciclosporina A 3 µg / ml)(15,16);
- línea celular con STI571(Imatinib mesilato, Glivec 2µM) (17);
- línea celular con CyA (3 µg /ml) +STI 571(2µM).

Apoptosis: Una alícuota de las células control y otra de las células tratadas, fueron centrifugadas a 200 g por 10 segundos. Al pellet de cada uno de los tubos, se le agregó 1 µl de naranja de acridina-bromuro de etidio (100 µg /ml de naranja de acridina más 100 µg ml⁻¹ de bromuro de etidio en PBS).

Las células fueron cuantificadas en un Microscopio de Fluorescencia según el siguiente criterio: (Figura 1)

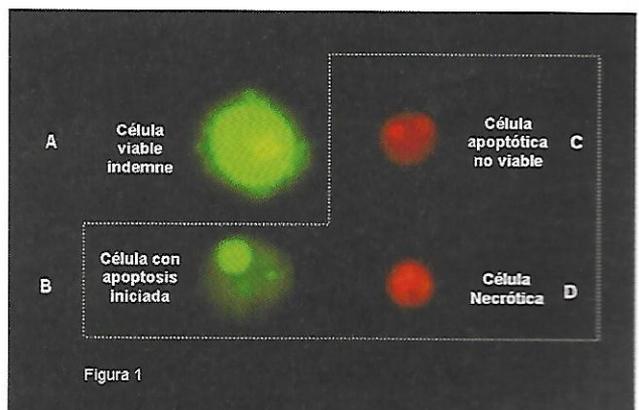
- Células viables indemnes con núcleos verde brillante y estructura organizada
- Células viables con apoptosis iniciada que presentan núcleos verde brillante con cromatina altamente condensada ó fragmentada
- Células no viables apoptóticas con núcleos naranja brillante y cromatina altamente condensada o fragmentada
- Células no viables necróticas con núcleos naranja brillante y cromatina organizada.

Se realizó el recuento sobre un total de 200 células, evaluadas por dos operadores y en 5 ensayos independientes.

Se calculó el porcentaje de células con apoptosis iniciada como:

$$\frac{\text{Número total de células viables con apoptosis iniciada (b) x 100}}{\text{Número total de células (a)+(b)+(c)+(d)}}$$

Se consideró el número de células no viables totales como (c)+(d)



Prueba funcional de P-gp con Rhodamina-123 (Rho-123)

La actividad de la P-gp fue determinada usando Rhodamina-123 (Rho -123, Sigma) por exclusión o acumulación del colorante. La expresión del gen MDR1 esta directamente relacionada a la eliminación de la Rho-123.

Las células K562 sin previo tratamiento fueron coloreadas con 150 ng/ml de Rho-123 por 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y en oscuridad. Después de realizar dos lavados con PBS las células fueron incubadas durante 3 hs con RPMI1640 y suero fetal bovino al 10% en las siguientes condiciones:

- 37 °C (Control positivo)
- 4°C (Control negativo)
- 37°C más el inhibidor (CyA (3 µg /ml).

Las células fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos, y el pellet fue incubado por 30 min a 4°C con 4 µl de 7 Amino Actinomicina D (AAD) para identificar a las células no viables y excluirlas del estudio. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACScan, equipado con Láser de Argón) usando una Longitud de onda de emisión [EM] de 520-534 para la Rho-123 y 630-650 nm para la longitud de onda de AAD. Se usó una muestra con células sin Rho-123 como control de autofluorescencia.

Análisis Estadístico:

Para el ensayo de apoptosis, se aplicó un test-t de dos colas para muestras no apareadas (Mann-Whitney test). El análisis fue hecho usando un software Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA). Se considero estadísticamente significativo para un valor $p < 0.05$.

Detección de P-gp por inmunocitoquímica:

Se realizó la detección de la P-gp por método inmunocitoquímico con dos anticuerpos monoclonales específicos; C219 de ratón (Signet) dirigido contra el epitope interno de secuencia aminoacídica altamente conservada, en el fragmento N-Terminal (18) y C494 de ratón (Dako) contra epitope interno localizado sobre el fragmento C-Terminal.(19) Para el anticuerpo C219 los citopreparados de las células sin tratamiento fueron fijados en una mezcla formol/acetona, luego se lavaron con una solución de TRIS-CLH 1M pH 7,8 y se incubaron overnight a 4°C con el anticuerpo primario (dilución 1/25) previo tratamiento con H₂O₂ al 3%. Para su detección se utilizó un método de estreptavidina-biotina marcada con Peroxidasa de rábano (HRP)(LSAB-Dako). Para el anticuerpo C494 los citopreparados fueron fijados en acetona durante 10 minutos a TA, luego se realizó una incubación over-

night a 4°C con el anticuerpo primario en una dilución 1:40 previo tratamiento con H₂O₂ al 3%. Como amplificador se utilizó el método de polímero de un paso (Sistemas DAKO EPOSTM).

Ambos anticuerpos fueron revelados con DAB y se usó Hematoxilina de Harris como contracolor. Como control positivo de la expresión de P-gp se estudió tejido de riñón humano embebido en parafina, el cual no recibió ningún tratamiento previo y como control de reacción inespecífica del segundo anticuerpo, se utilizó un citopreparado de la línea celular sin incubarse con el anticuerpo primario (datos no mostrados). Los citopreparados fueron obtenidos a partir de 100 µl de células en cultivo (10⁶ cel/ml), centrifugadas a 700 rpm por 10 minutos en una citocentrífuga Shandon III (Labsystem). Los preparados fueron secados durante 24 hs a TA y conservados a -70°C hasta el momento de su uso.

Aislamiento de ARNm

El ARNm fue extraído a partir de al menos 10⁷ células totales, con Trizol (20). La calidad del ARNm aislado fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, coloreado con 2 µl de bromuro de etidio.

RT-PCR

La retrotranscripción a ADN copia (ADNc) se realizó a partir de 2,5 µg de ARN total.

La mezcla de reacción fue preparada según se detalla: Buffer de Reacción 5X First- Strand Buffer, dNTPs (200mM), SuperScript II reverse transcriptase (transcriptasa reversa Invitrogen) (200U), oligo-dT (1µg).

Incubación a 42 °C durante 1 hora, luego calentamiento a 70°C durante 15 minutos para eliminar la actividad de la retrotranscriptasa.

PCR específicas:

a- MDR1

La presencia de transcriptos del gen MDR1 se realizó con modificaciones del método previamente descrito (21). La mezcla de reacción contiene: ADNc (2ul de una dilución de 1:5), Buffer Taq (1X), Mg₂Cl₂ (1,5mM), dNTPs (0,5mM), primers 3' y 5' (500nM), Taq polimerasa (1U)

Se utilizaron los siguientes primers:

• ABCB1-2749 Forward ATT TGG CAA AGC TGG AGA GA

• ABCB1- 2929 Reverse TTA CAG CAA GCC TGG AAC CT

Se amplificó un ciclo a: 95°C 10 minutos, y subsecuentes 40 ciclos a: 95°C 30 seg, 55°C a 30 seg; y 72°C 30 seg.

Finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 3 minutos.

Este procedimiento da un producto de amplificación de 200pb.

Además se amplificó el gen de fusión BCR-ABL teniendo en cuenta el trabajo de Kawasaki y Col (22) y el gen constitutivo gliceraldehido 3 fosfatodeshidrogenasa (GAPDH). Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % en buffer TAE 1x y coloreado con 5 µl de bromuro de etidio. Se visualizaron en un transiluminador UV.

RESULTADOS:

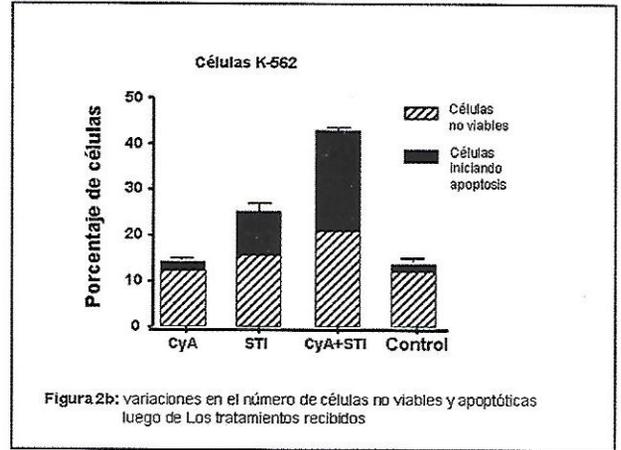
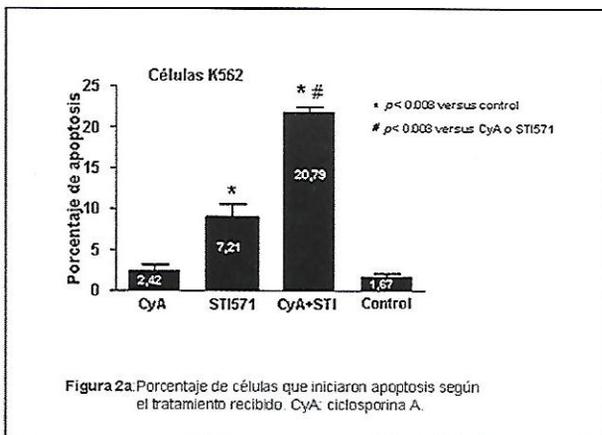
Apoptosis:

La combinación de Imatinib con ciclosporina, mostró un significativo aumento del número de células que iniciaron la apoptosis, comparado al tratamiento con Imatinib o ciclosporina solo. Estos últimos dos tratamientos no se diferenciaron de lo observado en las células controles no tratadas. Los valores expresados en % (media ± SD) se detallan en la Figura 2a.

control	1,7± 0,9
células tratadas con CyA	2,4±1,5
células tratadas con STI 571	7,2±1,9 (p< 0.008)*
células tratadas con CyA + STI 571	20,8±1,0 (p< 0.008)*#

Estos resultados indican una sensibilización de las células K562 al tratamiento combinado con ambas drogas, relacionado con la inhibición de la P-gp mediante la CyA.

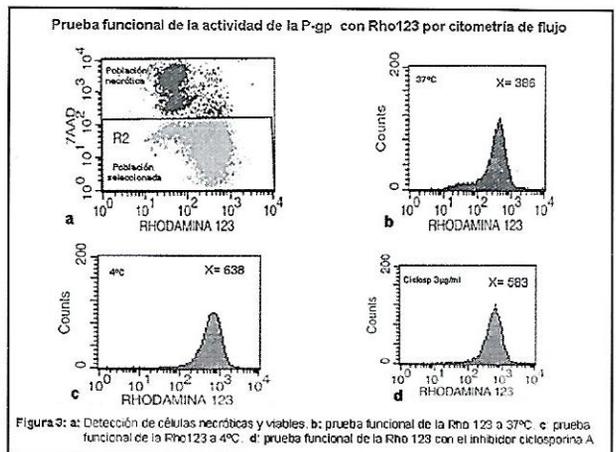
El porcentaje de células necróticas en cada ensayo no fue estadísticamente significativo, observándose únicamente un incremento en el porcentaje de células viables que iniciaron apoptosis. (Figura 2b)



Estudio de la Rhodamina-123:

La medida de la fluorescencia de la línea K562 sin Rho-123, permitió determinar la autofluorescencia espontánea. Por medio de la incubación con 7-Aminoactinomicina D (7AAD), se pudo estimar el número de células muertas. En todos estos ensayos el porcentaje de células muertas fue de alrededor del 22%, indicando que ni la temperatura o la CyA, por sí solas, modifican la condición de viabilidad de las células.

La media del Log de la intensidad de Fluorescencia emitida por la Rho-123 de las células a 4°C y a 37°C con CyA fue de 638 y 583 respectivamente y disminuyó a 386 en las células a 37°C sin CyA, indicando una presencia "activa" de la P-gp en las células, dado que la temperatura (4°C) y el inhibidor (CyA) inhibieron la proteína transportadora P-gp. Por lo tanto estos tratamientos potenciaron la tinción con el colorante fluorescente (Rho-123), lo cual se correlaciona en forma inversa con la expresión de P-gp. (Figura 3)



Detección de P-gp por Método Inmunocitoquímico:

Ambos anticuerpos (C219 y C494) detectaron la expresión de la Glicoproteína P-gp en la membrana de las células K562 sin tratamiento. El anticuerpo monoclonal C219 mostró una débil expresión en superficie y en un bajo número de células comparado con la intensidad de reacción intracitoplasmática revelado por el anticuerpo C494. El control + en tejido de riñón dio una reacción positiva en la región de los túbulos y en la membrana apical de los glomérulos; mientras que la membrana epitelial fue negativa (Figura 4). Estos resultados por inmunocitoquímica muestran claramente la expresión del gen MDR1 en la línea K562.

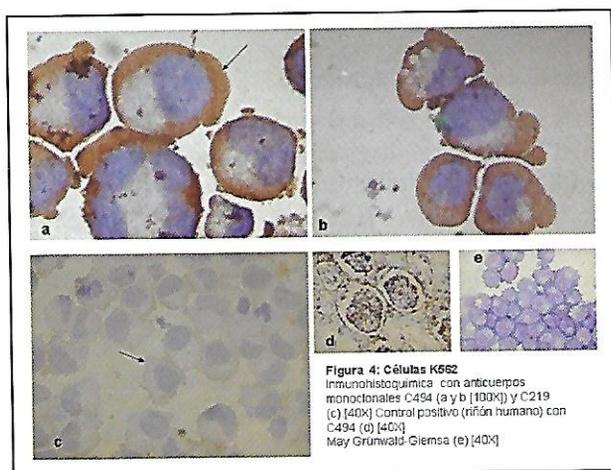


Figura 4: Células K562
Inmunohistoquímica con anticuerpos
monoclonales C494 (a y b) [100X] y C219
(c) [40X] control positivo (riñón humano) con
C494 (d) [40X]
May Grünwald-Giemsa (e) [40X]

Amplificación del gen MDR1:

La línea celular K562 expresa transcritos del gen MDR1 como se visualiza en la Figura 5 con una banda de 200pb, la expresión de transcritos de b3a2 confirman la presencia del reordenamiento BCR/ABL característico de esta línea celular. La gran intensidad de la banda b3a2 correlaciona con la amplificación BCR/ABL que posee la línea K562. El gen gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como gen constitucional para evaluar la calidad del ARN y ADNc obtenido.

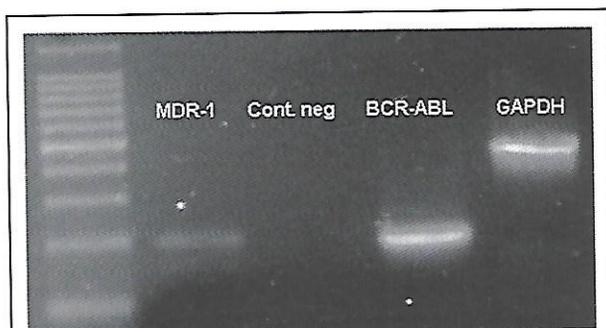


Figura 5: Las bandas obtenidas de MDR-1 y BCR-ABL de 200 bp, coinciden con el valor esperado acorde a los primers seleccionados en cada caso. Similarmente, la banda de 400bp, corresponde al gen GAPDH, utilizado como control de la reacción

DISCUSION

La etiopatogenia de las leucemias Philadelphia positivas radica en la presencia del gen quimérico BCR/ABL y su producto protéico (p210bcr/abl, p190bcr/abl o p230bcr/abl) con actividad constitutiva de tirosina quinasa (TK). Por lo tanto el uso de inhibidores de TK (Imatinib mesilato) constituye actualmente el tratamiento de elección (1). Sin embargo, luego de un periodo de respuesta muchos pacientes desarrollan resistencia a dicho tratamiento, lo cual puede ser atribuida a la amplificación génica con sobreexpresión del transcripto BCR/ABL, a la presencia de mutaciones en el dominio TK del ABL o bien a la sobreexpresión de la P-gp, producto del gen MDR1(10), entre otros.

En nuestro estudio, hemos podido documentar en la línea celular K562, la presencia de transcritos del gen MDR1, como así también su expresión proteica, visualizada por el uso de dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra dos diferentes epitopes de la glicoproteína P-gp. Además evidenciamos la actividad de la P-gp mediante el ensayo de funcionalidad realizado con Rho-123. Este último ensayo, puso de manifiesto que el sistema de bombeo de drogas desde el interior hacia el exterior celular se encuentra activo en las células K562.

El tratamiento con el inhibidor de la bomba (Ciclosporina A), o con hipotermia (4°C) mostró un nivel de acumulación de Rho-123 en el interior de las células, mayor que el observado en los cultivos controles sin inhibidor e incubadas a 37°C. Este hecho, sugirió que el Imatinib, podría sufrir igual destino que la Rho-123, es decir que una suerte de mecanismo de expulsión del Imatinib mediado por la P-gp desde el interior hacia el exterior de las células K562 sería un nuevo factor a tener en cuenta en el desarrollo de la refractariedad al tratamiento.

Ensayos previos en esta misma línea celular mostraron altos niveles de amplificación del gen BCR/ABL (23), esto implicaría cierto grado de resistencia al Imatinib en relación a la carga de BCR/ABL a inhibir por esta droga. Estos mecanismos han sido claramente relacionados con pérdida de sensibilidad al tratamiento con Imatinib (8, 9). Si bien se han reportado datos que relacionan a la actividad de la P-gp con la refractariedad al Imatinib, todavía existen resultados controvertidos (24, 25,26).

La administración de Imatinib, conjuntamente con dosis de CyA capaces de recuperar la acumulación intracelular de Rho-123, mostró un incremento significativo en el número de células viables que iniciaron la apoptosis.

En estas condiciones las mayores variaciones se hallaron cuando se consideró como variable al número de células viables iniciando apoptosis (categoría b). Este dato, no debería extrañarnos, ya que nos muestra

el resultado de la variable más sensible (el paso de las células viables indemnes a células viables apoptóticas), al tratamiento quimioterapéutico, el cual justamente pretende inducir o iniciar la apoptosis celular.

Dado que las células K562 estudiadas en nuestros experimentos son p53 negativas, los resultados indican que necesariamente se han inducido vías apoptóticas alternativas independientes de p53 y que aún no hemos estudiado. La identificación del mecanismo pro-apoptótico desencadenado, será sin duda una herramienta clave que ayude a incrementar la eficacia del tratamiento de la LMC con Imatinib.

Nuestros resultados indican que la línea celular K562, es MDR1 positiva y que la glicoproteína P-gp se encuentra altamente expresada y activa. Dado que el nivel de apoptosis logrado es aún insuficiente, es factible que otros transportadores de drogas, u otros miembros de la familia ABC, pudieran estar presentes y activos en estas células, los cuales deberán también ser investigados en relación a la terapéutica con Imatinib. Sin embargo, en estos primeros experimentos, la búsqueda de transcritos del gen MDR1, su proteína y la medición de su funcionalidad, demuestran que este gen, juega un rol adicional en el desarrollo de la macroresistencia al Imatinib.

Por lo tanto la administración del inmunosupresor CyA facilitaría la acción del inhibidor de tirosina quinasa, aumentando el porcentaje de apoptosis en las células BCR/ABL positivas.

Estos estudios son de importancia y de trascendencia pues permitirían vencer la refractariedad y optimizar los tratamientos en casos con amplificación génica y expresión del gen de resistencia a drogas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a los Subsidios de CONICET; ANPCyT y FUNDACIÓN Alberto J. ROEMMERS.

REFERENCIAS

- Goldman J., Melo J. Chronic myeloid leucemia. Advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; 49: 1451 – 1464.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoint are clustered within a limit region, bcr on chromosome 22. *Cell* 1984; 36 :93-99.
- Melo J. The diversity of bcr-abl fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88: 2375 – 2384.
- Skorki T., Kanakaraj P., Nieborowska-Skorska M. y Col. Phosphatidylinositol-3kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995; 86:726-36.
- Varticovski L., Daley G., Jackson P y Col. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11:1107 1118.
- Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann, Matter A. Glivec (STI571, IMATIB), a rationally developed targeted anticancer drug. *Nature Reviews* 2002 ,1: 493- 502.
- Deininger M., Buchdunger E., Druker B. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005, 105: 2640 – 2653.
- Weisberg E., Griffin J. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000, 95: 3498 – 3505.
- Gorre M., Mohammed M., Ellwood y Col. Clinical resistance to STI-571. Cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001, 293: 876-880.
- Hochhaus A., Kreil S., Corbin A. Y Col. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*, 2002, 16: 2190- 2196.
- Labielle S., Gayet L., Marthinet E., Rigal D., Gaggetto L. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochemical Pharmacology* 2002, 64: 943 – 948.
- Gros P., Ben Neriah Y., Croop J., Housman D. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986, 323: 728-231.
- Aouali N., Eddabra L., Macadre J., Morjani H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crt. Rev. Oncol. Hematol*, 2005, 56: 61 – 70
- Theis J., Liao-Chu M., Chan H y Col. Anaphylactoid reactions in children receiving high-dose intravenous cyclosporine for reserall of tumor resistance: the causative role of improper dissolution of Cremophor. *J Clin Oncol* 1995, 13: 2508 – 2516.
- Loor F ; Tiberghien F; Wenandy T; Didier A and Traber R Cyclosporins: Structure- Activity Relationships for the Inhibition of the Human MDR1 P-Glycoprotein ABC Transporter. *J.Med. Chem*, 2002; 45: 4598-4612.
- FU Jianxin; Chen Z; Cen J and Ruan CH. Expression of the human multidrug resistance gene mdr1 in leukemic cells and its application in studying P-glycoprotein antagonists *Chin Med J* 2000; 113: 228-231.
- Vellon L., Gonzalez Cid M., Campos Nebel M., Larripa I. Additive apoptotic effect of STI571 with the cytoprotective agent amifostine in K-562 cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 602 – 608,
- Van den Elsen JM; kuntz D; Hoedemaeker JF, and Rose D. Antibody C219 recognizes an α - helical epitope on P-glycoprotein. *PNAS*. *Biochemistry* 1999; 23:13679-13684
- Volk H, Potschka H, Löscher W Immunohistochemical Localization of P-glycoprotein in Rat Brain and Detection of Its Increased Expression by Seizures Are Sensitive to Fixation and Staining Variables *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 517–531.
- Choczynski P; Sacchi N; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem*, 1987,162: 156-159.
- Wang C., LaRue H., Fotin A y Col. Mdr1 mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy. *Breast Cancer Reserch and Treatment* 1997; 45: 63 – 74.
- Kawasaki E., Clark S., Coyne M. y Col. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leucemias by detection of leucemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1988; 85: 5698 – 5702.
- Wu SQ., Voelkerding KV, Sabatini L; Chen XR, Huang J, Meisner LF. Extensive amplification of bcr/abl fusion genes clustered on three marker chromosomes in human leukemic cell line k-562. *Leukemia* 1995,9: 858-62.
- Ferrao P., Frost M., Siah S., Ashman L. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood* 2003; 102:4499-4503.
- Rumpld H., Wolf A., Gruenewald K., Gast G., Gunsilius E., Wolf D. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Experimental Hematology* 2005; 33: 767 – 775.
- Drummond M., Holyaake T. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukaemia: so far so good?. *Blood Reviews* 15: 85 – 95, 2001.