

(043) "1997" cal

Departament de Medicina

Universitat de Lleida



Universitat  
Registr

10 NOV. 1997

E: 6794

S:

**RESISTENCIA MULTIPLE A DROGAS. ESTUDIO IN  
VITRO DEL EFECTO MODULADOR DE PSC 833 Y  
TAMOXIFEN EN UN MODELO EXPERIMENTAL**



## MATERIAL Y METODOS

## V.- MATERIAL Y METODOS

### 1.- PLANTEAMIENTO METODOLOGICO

El modelo experimental se desarrolla con la finalidad última de valorar la acción moduladora de diferentes sustancias sobre P-gp 170. Para ello es imprescindible empezar con una valoración tanto cuantitativa como cualitativa de la glicoproteína.

La valoración cuantitativa se basa en la utilización de un anticuerpo monoclonal que reconozca un epítipo externo de P-gp 170, que está ausente en las células salvajes y presente en las células transfectadas con el gen *mdr1*. Es evidente que esta circunstancia, ya que se trabaja con líneas celulares, debe ser comprobada a lo largo del tiempo para asegurar la validez de los experimentos.

Para la valoración cualitativa o funcional de P-gp 170 se estudia la dinámica de incorporación y expulsión de sustancias conocidas como sustratos de la misma, confirmándose que la bomba de expulsión es funcionante. En nuestro trabajo utilizaremos dos sustancias fluorescentes: RH 123 (por su reconocida relación con el fenómeno MDR y su intensa fluorescencia) y DNR (por ser uno de los fármacos quimioterápicos de amplio uso en enfermedades onco-hematológicas). Se valoran los cambios en la fluorescencia intracelular en presencia de estas sustancias, cuantificándose por técnicas de CMF.

La modulación de P-gp 170 se valora observando la modificación en la incorporación y expulsión de RH 123 y DNR en presencia de sustancias con reconocida capacidad para revertir el fenómeno MDR. El estudio de nuevos moduladores se realizará comparando su acción con fármacos de acción moduladora demostrada, como el VRP. Estos fármacos se estudiarán a diferentes concentraciones, diferentes tiempos de incubación, aislados o en combinación. Con ello se pretende valorar las condiciones óptimas para su acción moduladora y predecir su posible aplicación en la clínica.

Se realizarán siempre estudios en paralelo sobre fibroblastos transfectados con el gen *mdr1* y fibroblastos salvajes, es decir, sin la expresión de P-gp 170 que servirán de controles negativos. Las conclusiones se obtendrán de la comparación de resultados entre ambos tipos celulares y entre los diferentes fármacos en condiciones estrictamente iguales.

Todos los experimentos se acompañarán de estudios de viabilidad celular al inicio y al final de los mismos para asegurar unas condiciones adecuadas de trabajo.

En resumen, para poder poner en marcha el modelo experimental, se necesitarán líneas celulares positivas y negativas para MDR, sustancias fluorescentes conocidas como substratos de P-gp 170, drogas moduladoras de la glicoproteína y un método de medida de fluorescencia. Una vez validado el modelo se continuará el estudio con la valoración de nuevas sustancias potencialmente moduladoras de MDR.

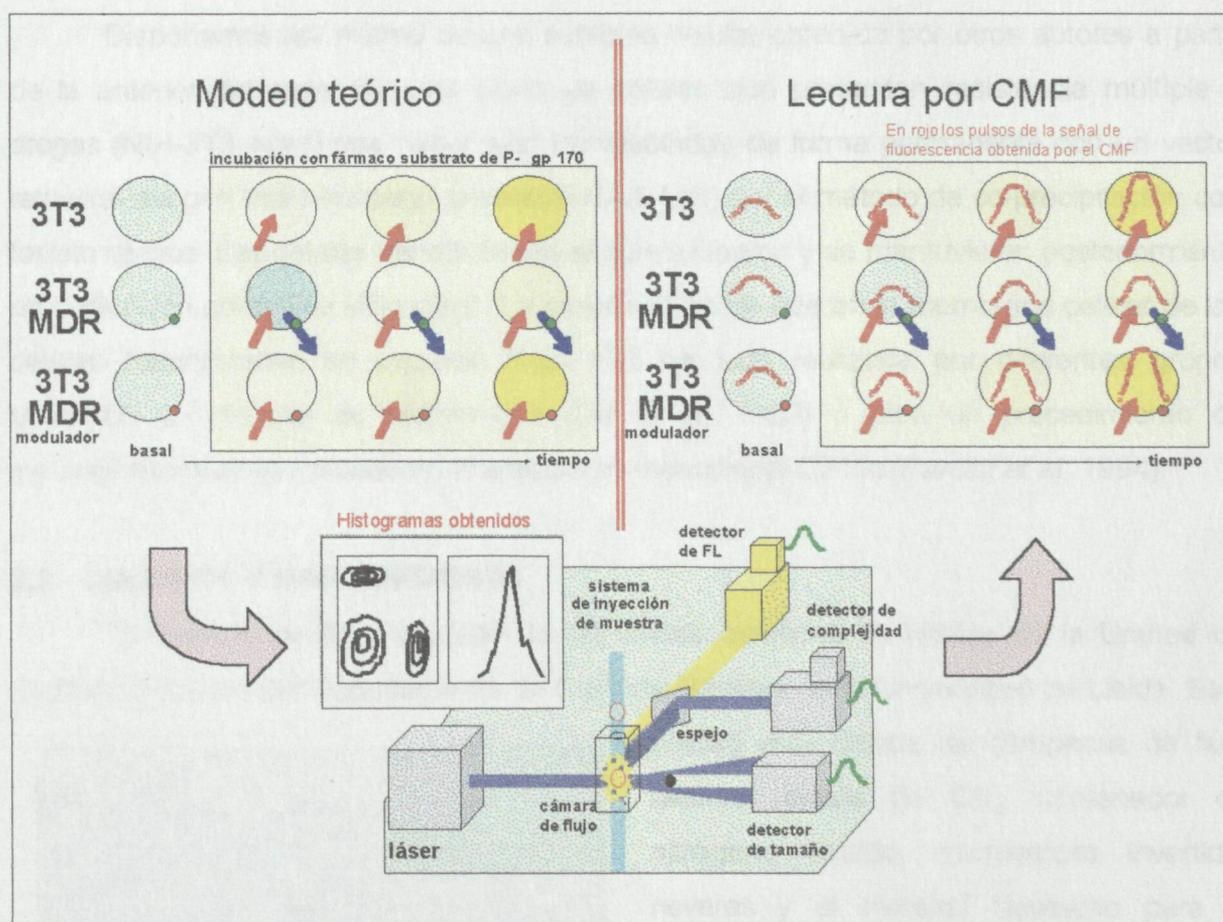


Figura 4: Nuestro estudio de base en un modelo teórico en el que tras la incubación de células sensibles, células con fenotipo MDR y células con fenotipo MDR en presencia de un fármaco modulador de la bomba. La concentración intracelular de DNR en el equilibrio será inferior en las células que expresan la bomba funcionando respecto a las células sensibles o resistentes incubadas con un modulador de P-gp 170. La CMF permite el estudio de la fluorescencia intracelular que va a ser proporcional a la cantidad de DNR fluorescente intracelular.

## 2.- LINEAS CELULARES

### 2.1.- FIBROBLASTOS NIH-3T3

Disponemos de una línea celular continua de fibroblastos denominada NIH-3T3, derivada de cultivos de embrión de ratón NIH Swiss, que se demuestra sensible a la acción de los quimioterápicos y que utilizaremos como control de genotipo MDR negativo (Shen *et al*, 1986). Esta línea celular no presenta ningún mecanismo de resistencia a fármacos conocido.

Disponemos así mismo de una sublínea celular obtenida por otros autores a partir de la anterior, formada por una clona de células que presentan resistencia múltiple a drogas (NIH-3T3-*mdr1*) tras haber sido transfectadas de forma permanente con un vector retroviral del gen *mdr1* humano (pHaMDR1/A-G185) por el método de co-precipitación con fosfato cálcico. Las células transfectadas se seleccionaron y se mantuvieron posteriormente en cultivo con colchicina (60 ng/ml). La confirmación de que en la membrana celular de las células transfectadas se expresa P-gp 170 ha sido realizada por diferentes grupos utilizando un método de western-blot (Gill *et al*, 1992) o bien un procedimiento de inmunohistoquímica (basado en el anticuerpo monoclonal C219) (Sardini *et al*, 1994).

### 2.2.- CULTIVOS Y MANTENIMIENTO

El mantenimiento y cuidado de las líneas celulares se realiza en la Unidad de Cultivos Celulares del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de Lleida. Esta



Foto 1: Fibroblastos creciendo en monocapa en la placa de cultivo. (Microscopio de fases, x 40)

unidad está dotada de campanas de flujo laminar, estufa de CO<sub>2</sub>, contenedor de nitrógeno líquido, microscopio invertido, neveras y el material necesario para el mantenimiento de las células. Estas líneas celulares se encuentran criopreservadas en nitrógeno líquido utilizando DMSO como conservante. Para su utilización son sometidas a una descongelación rápida a 37 °C, siendo las células inmediatamente

resuspendidas en medio de cultivo. El medio utilizado para su crecimiento es DMEM (Sigma D-5648), enriquecido con un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (56 °C,

60 minutos) Además contiene 3.7 gramos de bicarbonato sódico (Sigma S- 5761) y antibióticos (20 mgrs de estreptomycin y 20000 uu de penicilina) Posteriormente se disponen en placas de cultivo (se utilizan placas de 40, 60 y 100 mm tipo Corning), en estufa a 37 °C con aire humidificado suplementado con 5 % de CO<sub>2</sub> Las células presentan un crecimiento en monocapa requiriendo cambios de medio de cultivo cada 48 horas aproximadamente para evitar la acidificación (ver Foto 1) Además, es fundamental evitar el sobrecrecimiento, por lo que siempre que sea necesario se realizan subcultivos (habitualmente cada 48-72 horas) El crecimiento celular se controla tanto macroscópicamente, observando la placa de cultivo, como utilizando un microscopio invertido que nos permite visualizar las células y detectar posibles trastornos en su proliferación Así mismo se controla la posibilidad de contaminación, bacteriana o fúngica, que obligaría a desechar dichas células

Se trabaja en todo momento en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar

#### 2.2.1 - Protocolo de descongelación de líneas celulares

- 1 - La alícuota de células congeladas (que contiene 0.5-1 ml de suspensión celular) se introduce inmediatamente en un baño a 37 °C
- 2 - Seguidamente se resuspende el contenido de la alícuota en 9 ml de medio DMEM a 37 °C, utilizando un tubo de plástico cónico de 10 ml
- 3 - Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos
- 4 - Se aspira el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 1 ml de medio DMEM a 37 °C Se homogeneiza y posteriormente se añaden 4 ml de medio a 37 °C si se va a cultivar en placa de 60 mm ó 9 ml de medio a 37 °C si se hace en placa de 100 mm
- 5 - La placa se coloca en la estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C

#### 2.2.2 - Cambio de medio de cultivo

- 1 - Se obtiene la placa y se aspira el medio sobrenadante por los laterales
- 2 - Se añade medio DMEM atemperado a 37 °C también por los laterales (5 ml si la placa es de 60 mm y 10 ml si la placa es de 100 mm)
- 3 - Se dejan las placas en la estufa de CO<sub>2</sub>

#### 2.2.3 - Protocolo de realización de subcultivos

- 1 - Se obtiene la placa y se aspira el medio sobrenadante por los laterales
- 2 - Se añade PBS atemperado a 37 °C (4 ml en placa de 60 mm y 7 ml en placa de 100 mm) y se realizan movimientos circulares con el fin de lavar la superficie celular, aspirándose posteriormente

- 3.- Se dispensa en la placa tripsina a 37 °C (0.25 % trypsin-EDTA solution. Sigma T-4049) (1.5 ml en placa de 60 mm y 3 ml en placa de 100 mm), dejándola actuar durante aproximadamente 15 segundos. Posteriormente, y con la ayuda de una pipeta con punta de 1 ml, se facilita el despegamiento de las células del suelo de la placa.
- 4.- Se añade medio a 37 °C hasta 5 ó 10 ml según tamaño de la placa (para neutralizar la acción de la tripsina ya que contiene antitripsinas) y la suspensión se dispensa en un tubo cónico de plástico de 10 ml.
- 5.- Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos y se aspira el sobrenadante.
- 6.- El botón celular se resuspende cuidadosamente en 1 ml de medio DMEM a 37 °C, con ayuda de una pipeta con punta de 1 ml.
- 7.- Se añade 9 ml de medio DMEM a 37 °C.
- 8.- Se rotulan las placas de cultivo con datos de fecha, tipo celular y número de pase o subcultivo así como la concentración celular.
- 9.- Se dispensa la cantidad deseada de suspensión celular con una pipeta y posteriormente se rellena con medio DMEM hasta 6 ó 10 ml según el tamaño de la placa. Se realiza un movimiento en cruz para que las células se depositen de forma dispersa y uniforme.
- 10.- Las placas se introducen en la estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### 2.3.- OBTENCION DE SUSPENSIONES CELULARES

Dado que nuestro estudio se basa en la utilización de técnicas de CMF, es necesario trabajar con suspensiones celulares. Para obtener fibroblastos en suspensión, a

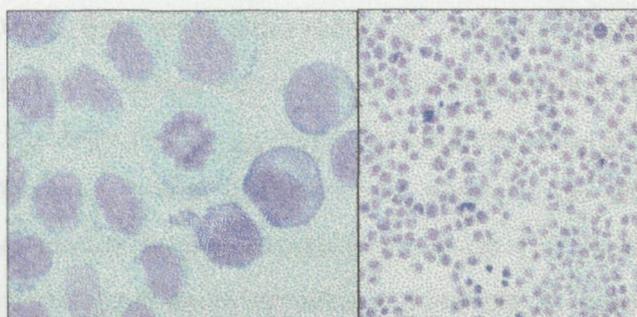


Foto 2: Fotografías a alto (x 100) y bajo (x 10) aumento de fibroblastos de la línea celular 3T3-*mdr1*.

partir de la placa de cultivo se realiza una técnica de tripsinización rápida, a través de la cual en pocos minutos, se puede disponer de las células suspendidas en medio de cultivo. En ese momento las células están preparadas para su procesamiento y lectura (ver protocolo de realización de subcultivos). La observación de los fibroblastos, una vez despegados de la placa es posible, realizando una citocentrifugación, tinción convencional y observación al microscopio óptico (ver Foto 2).

## 2.4.- ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR

Los tests de viabilidad celular se realizan previamente a cada experimento y al finalizar el mismo, para asegurar que trabajamos con células viables. Estos tests se basan en la utilización de yoduro de propidio (Coulter<sup>®</sup> DNA-Prep), un colorante no vital fluorescente que reacciona estequiométricamente con las moléculas de DNA, requiriendo que la membrana celular sea permeable para su entrada en la célula.

Se realiza el siguiente protocolo

- 1 - En un tubo de plástico de 3 ml, se dispensan 100  $\mu$ l de suspensión celular
- 2 - Se añaden 100  $\mu$ l de permeabilizante
- 3 - Se agita suavemente en un vortex durante 8 segundos
- 4 - Se añaden 2 ml de yoduro de propidio
- 5 - Se deja incubar durante 10 a 20 minutos en la oscuridad
- 6 - Se procede a la lectura por el citómetro de flujo (ver apartado de CMF)

En las células viables, por tanto con membrana íntegra, no se produce entrada del colorante y la señal fluorescente es negativa, distinguiéndose claramente de las células dañadas. Hemos considerado un mínimo del 90 % de células viables de inicio para considerar válido el experimento.

## 2.5.- ESTUDIO DE EXPRESION DE P-GP 170

Para el estudio de la expresión de P-gp 170 se utiliza el anticuerpo monoclonal 4E3 (Anticuerpo monoclonal de origen murino contra P-gp 170, clona 4E3, código no M523, Dako). Este anticuerpo reconoce un epítipo externo de P-gp 170 (Arceci *et al*, 1993). Se emplea una técnica de inmunofluorescencia indirecta (se utiliza un anticuerpo secundario fragmento F(ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulinas anti-ratón, conjugado con R-PE código no Ro439, Dako) y un test de CMF (ver apartado de citometría de flujo). Evidenciamos una alta positividad para la expresión de P-gp 170 en la membrana de las células transfectadas, mientras que se comprueba la ausencia de la bomba en las células salvajes.

Se realiza el siguiente procedimiento

- 1 - Se obtienen suspensiones de las células 3T3-*mdr1* y 3T3 en medio DMEM
- 2 - Dispensar en dos tubos de 3 ml rotulados  $1 \times 10^6$  de células de cada tipo en cada tubo
- 3 - Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm

- 4.- Decantar el medio sobrenadante.
- 5.- Resuspender el botón celular en medio hasta obtener 100  $\mu$ l de muestra.
- 6.- Añadir 5  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal primario (4E3) y agitar en un vórtex.
- 7.- Incubar durante 15 minutos a 37 °C y protegidas de la luz.
- 8.- Lavar con 2 ml de PBS atemperado. Centrifugar y aspirar el sobrenadante, dejando 100  $\mu$ l de muestra.
- 9.- Añadir 5  $\mu$ l del anticuerpo secundario (antiratón-IgG) y agitar en un vórtex.
- 10.- Incubar durante 15 minutos a 37 °C y protegido de la luz.
- 11.- Lavar con 2 ml de PBS atemperado y resuspender en medio DMEM.
- 12.- Realizar la lectura por CMF utilizando un test específico previamente desarrollado (ver anexo 6)

### 3.- SUBSTRATOS FLUORESCENTES DE P-gp 170

Para el estudio funcional de P-gp 170 empleando la CMF se deben utilizar sustancias fluorescentes que se conocen como sustratos de la bomba. Las que nosotros hemos empleado en nuestro trabajo se exponen a continuación:

#### 3.1.- RODAMINA 123

La RH 123 es un colorante supravital catiónico y lipofílico con propiedades fluorescentes. Es capaz de excitarse a 488 nm y emite una fluorescencia intensamente brillante. Se conoce como sustrato de P-gp 170 (Neyfakh *et al*, 1988; Efferth *et al*, 1989). Es además una sustancia capaz de penetrar en el interior de las mitocondrias, por cambios en su potencial de membrana, lo que en cierta medida puede limitar su aplicación en estos experimentos.

Hemos utilizado RH 123 (Sigma R-8004), que debe prepararse disuelta en agua destilada a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  (a partir de una solución madre 50  $\mu\text{M}$ ).

#### 3.2.- DAUNORRUBICINA

La DNR es un antibiótico antitumoral antraciclínico ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades onco-hematológicas. Tiene propiedades fluorescentes, siendo capaz de excitarse con una luz de 488 nm y emitir con un máximo de 600 nm, aunque produciendo una fluorescencia menos intensa que la RH 123. Ha sido utilizado para el estudio funcional de Pgp 170 por diferentes grupos (Herweijer *et al*, 1989; Gheuens *et al*, 1991). Dado que su espectro de emisión es muy diferente al de FITC, es posible realizar estudios multiparamétricos de expresión de antígenos y cinética de incorporación de DNR.

Hemos utilizado daunorrubicina (Daunomycin hydrochloride crystalline, Sigma D-8845), disuelto en agua destilada, a una concentración final 2  $\mu\text{M}$  (a partir de una solución madre 20  $\mu\text{M}$ ).

## 4.- FARMACOS MODULADORES

Para validar el modelo y los resultados de los nuevos moduladores a estudio, así como comprobar la capacidad de P-gp 170 de ser inhibida, se utilizan fármacos con acción moduladora conocida

El empleo de moduladores “control” permite asegurar que la modulación es la responsable de los cambios de fluorescencia celular en el equilibrio debido a un diferente acumulo de DNR por modulación de la bomba y estudiar la capacidad relativa de modulación de los fármacos moduladores estudiados entre sí y respecto a un control de modulación completa. Las concentraciones finales y tiempos de incubación de todos los fármacos empleados, tanto del modulador control como de los fármacos a estudio han sido ajustadas en nuestro laboratorio, si bien son similares a las condiciones descritas y empleadas por la mayoría de autores que trabajan sobre MDR.

### 4.1.- VERAPAMILO

El verapamilo es un fármaco bloqueante de los canales del calcio con demostrada acción inhibitoria de P-gp 170 a través de un mecanismo de inhibición competitiva (Tsuruo *et al*, 1982).

Hemos utilizado verapamilo (Verapamil hydrochloride, Sigma V-4629) disuelto en agua destilada y a concentraciones finales de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M (solución madre 100  $\mu$ M).

### 4.2.- SDZ PSC 833

SDZ PSC 833 ([3'-keto-Bmt1]-Val2]-Cyclosporine) es un análogo no inmunosupresor de la ciclosporina D desarrollado por Sandoz todavía no comercializado (SDZ 215-833). Este nuevo fármaco ha sido descrito por algunos autores como un potente modulador de MDR (Gaveriaux *et al*, 1991; Boesch *et al*, 1991a; Jachez *et al*, 1993; Archinal-Mattheis *et al*, 1995), atribuyéndosele una mayor actividad moduladora que la ciclosporina A (aproximadamente 10 veces más) y con menores efectos de inmunosupresión y nefrotoxicidad a concentraciones muy bajas (0.5 - 1  $\mu$ M).

Hemos utilizado SDZ PSC 833 (Sandoz 215-833) disuelto en etanol/Tween 80 (9:1) y diluido 1/20 en agua destilada a concentraciones finales de 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  (soluciones madre de 840 y 20  $\mu\text{M}$ ).

#### **4.3.- TAMOXIFENO**

Tamoxifeno es un antiestrógeno sintético, con supuesta capacidad para modular P-gp 170 (Ramu *et al*, 1984; Berman *et al*, 1991). Hemos utilizado tamoxifeno (Tamoxifen free base, Sigma T-5648 y Tamoxifen citrate salt, Sigma T-9262). Se empleó disuelto en etanol a concentraciones finales de 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  (solución madre 200  $\mu\text{M}$ ).

## 5.- ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO

### 5.1.- CARACTERISTICAS DEL CITOMETRO DE FLUJO

Se emplea un EPICS PROFILE I (Izasa-Coulter) (luz a 488 nm de 15 mW, capacidad para medir 3 canales de fluorescencia, forward scatter y side scatter) implementado con el paquete "Power Pack" (cuarto fotomultiplicador, histogramas logarítmicos de cuatro décadas, discriminador de señal de pico), lo que equivale a convertirlo a PROFILE II (más otro fotomultiplicador) Es un citómetro de cámara cerrada sin sorter

En determinados experimentos se ha empleado citómetros de adquisición continua como son FACScan y FACS Vantage con FACS station (Luz UV a 50 mW y luz 488 nm a 200mW, capacidad para medir 3 canales de fluorescencia, forward scatter y side scatter, configuración variable de la bancada óptica, filtros, capacidad de separación electrostática o sorter) (Becton-Dickinson)

### 5.2.- ALINEACION DEL CITOMETRO

Diariamente, antes de proceder a la lectura, se realiza una calibración del alineación del sistema, con bolas fluorescentes de látex (Calibrite® Beads, Becton-Dickinson), con el fin de estandarizar las mediciones

- 1 - Calibrite® Beads se mantienen en todo momento a 4°C y protegidas de la luz
- 2 - En un tubo de plástico de 3 ml se dispensa 1 ml de fluido de arrastre (FACS Flow, Becton Dickinson) y se añade una gota de bolitas fluorescentes, agitando la suspensión para homogeneizar
- 3 - Se realiza la lectura por el citómetro de flujo utilizando un test específico (ver anexo 1) ajustando el citómetro para conseguir una intensidad de señal de los parámetros reproducible día a día

### 5.3.- CREACION DE TESTS ESPECIFICOS

5 3 1 - Test para el estudio de acúmulo de fármacos en el interior celular Se ha utilizado un test específico para la valoración de la modificación de la fluorescencia intracelular en relación con el tiempo (ver anexo 2) Para realizar la lectura por CMF es necesario disponer de suspensiones celulares, tanto de las células salvajes como de las

control. Se utilizarán tubos de plástico rotulados convenientemente con  $0.5 \times 10^6$  células por cada tubo resuspendidas en DMEM a 37 °C. Tras la aspiración de una cierta cantidad de muestra y a una velocidad de flujo predeterminada, seleccionamos la población homogénea de fibroblastos por sus características de tamaño y complejidad citoplasmática (forward y side scatter) en un histograma biparamétrico.

Para valorar la cantidad de fluorescencia intracelular nos basamos en un histograma monoparamétrico de fluorescencia en relación al número de células. En los experimentos con RH 123 se ha elegido la emisión de luz verde en escala lineal (FL2). En los experimentos con DNR la emisión de luz fluorescente se mide en el espectro amarillo-rojo y de forma logarítmica (LFL3) porque la señal es mucho más débil.

Se realizan lecturas sucesivas en diferentes tiempos valorándose las modificaciones en fluorescencia en cada momento, que serán debidas y proporcionadas a la mayor o menor retención de fármaco fluorescente en el interior celular.

Este test se aplica tanto en estudios de incorporación como en estudios de expulsión.

5.3.2 - Estudio de la viabilidad celular. Los tests de viabilidad celular se realizan previamente a cada experimento, y al finalizar el mismo, para asegurar que trabajamos con células viables. Estos tests se basan en la utilización de yoduro de propidio (Coulter<sup>®</sup> DNA-Prep) (ver apartado de líneas celulares). En las células con membrana íntegra, no se produce entrada del colorante y la señal fluorescente es negativa, distinguiéndose claramente de las células dañadas. Se ha utilizado un test basado en la cuantificación de DNA por CMF. El histograma de DNA se representa en FL3 (ver anexo 3 y 4).

5.3.3 - Contaje celular. Con el fin de asegurar que trabajamos con igual número de células en todos los experimentos y dado que el citómetro de flujo no proporciona contajes celulares absolutos, hemos utilizado un método de contaje exacto basado en el uso de tubos especiales que contienen una cantidad conocida de pequeñas bolas fluorescentes (Trucount<sup>®</sup> absolute count tubes Becton-Dickinson), (ver anexo 5).

- 1 - Se dispensa 1 ml de suspensión celular en cada tubo de Trucount.
- 2 - Se agita con el fin de deshacer el botón de bolitas y homogeneizar la muestra.
- 3 - Se realizan tres lecturas secuenciales de cada tubo en un test predeterminado en el citómetro de flujo (ver anexo 5).
- 4 - Las bolitas se distinguen de las células por sus características de forward y side scatter así como de fluorescencia (representada en LFL1).

5.- Se calcula la concentración celular realizándo la media de las tres lecturas en relación al número de bolitas que el citómetro ha detectado en cada una y a la cantidad de bolitas de cada tubo.

6.- Posteriormente se calcula la cantidad de suspensión celular que se necesita en cada tubo para trabajar con  $0.5 \times 10^6$  células por tubo.

5.3.4.- Detección cuantitativa de P-gp 170: Para demostrar la presencia continuada de P-gp 170 en la membrana de las células transfectadas y su ausencia en las células salvajes utilizamos el anticuerpo monoclonal 4E3 (Dako) que reconoce un epítipo externo de la glicoproteína (Arceci *et al*, 1993) (ver apartado de líneas celulares y anexo 6).

## 6.- DISEÑO DEL ESTUDIO

### 6.1.- CONSIDERACIONES PRELIMINARES

Los primeros experimentos se realizaron utilizando RH 123 como sustancia fluorescente con buenos resultados pero con el problema de que su intensa fluorescencia dificultaba la realización de estudios multiparamétricos. Por ello se decidió realizar el trabajo definitivo con DNR ya que su menor intensidad en la emisión de fluorescencia era suficiente para nuestro experimento y no interfería con otros estudios, obteniendo también muy buenos resultados.

Inicialmente se utilizó VRP como conocido fármaco modulador, con el fin de poner a punto y validar el modelo experimental. Posteriormente se aplicó el modelo para el estudio de otras sustancias con supuesta capacidad moduladora de P-gp 170, como tamoxifeno y PSC 833.

Se han realizado 18 experimentos de incorporación y expulsión completos y homogéneos en cuanto a condiciones de realización en las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, cuyos resultados se detallan en el apartado de Resultados. De estos experimentos únicamente en 14 se tienen datos de la modulación con VRP y PSC 833, y son los que se muestran en ese apartado.

6.1.1 - Estudios de viabilidad celular. Para asegurar que en todo momento trabajáramos con células viables, se realizaron antes y después de cada experimento, estudios de viabilidad considerándose un mínimo de 90 % de células viables para llevar a cabo el experimento.

6.1.2 - Estudios a diferentes temperaturas. Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones estrictas de temperatura a 37 °C. Para valorar la influencia de la temperatura en la acción de P-gp 170 y en la dinámica de entrada y salida de fármacos, se realizaron previamente experimentos a diferentes temperaturas, 4 °C, 22 °C y 37 °C.

Del mismo modo que reportan otros autores, a temperaturas inferiores a 37 °C se comprobó una reducción de la entrada y salida de fármacos no sólo en las células transfectadas si no también en las salvajes.

La temperatura no afecta tan sólo la actividad de P-gp 170 (bomba ATP-dependiente) si no también a la permeabilidad de la membrana celular al fármaco (posiblemente por cambios conformacionales o de densidad de la membrana).

## 6.2.- ESTUDIO BASICO DE INCORPORACION DE FARMACOS EN CELULAS 3T3

Con el fin de definir la cinética de incorporación de sustancias fluorescentes en las células y la capacidad del modelo experimental para valorar dicha incorporación, realizamos un primer estudio en las células salvajes (3T3)

En estos estudios iniciales se realizaron medidas de fluorescencia continuas y después secuenciales pero con lecturas cada minuto en los primeros 10 minutos y cada 5 minutos hasta 2-3 horas con el fin de establecer las curvas exactas de cinética de incorporación

Una vez se estableció esta cinética y se demostró que el equilibrio se establecía a los 60 minutos, decidimos realizar lecturas más espaciadas en el tiempo

- 1 - Las células 3T3 en suspensión (DMEM, 37 °C) se dispensan en tubos de plástico de 3 ml ( $0.5 \times 10^6$  células por tubo) y se exponen a una concentración final de DNR  $2 \mu\text{M}$  (RH  $123.5 \mu\text{M}$ ) ( $900 \mu\text{l}$  de suspensión celular +  $100 \mu\text{l}$  de la solución madre de DNR  $20 \mu\text{M}$ )
- 2 - Previamente se realiza una medida basal de fluorescencia para evaluar la posible autofluorescencia celular (ver apartado anterior)
- 3 - Tras la adición de DNR se realizan medidas consecutivas de fluorescencia intracelular (expresada en unidades arbitrarias) a diferentes tiempos predeterminados inmediatamente tras la exposición a DNR, a los 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos (momento en que se consigue la estabilidad en la fluorescencia intracelular)
- 4 - A partir de las lecturas de las muestras por CMF se obtienen diferentes histogramas. Utilizando sus valores medios se construyen curvas de incorporación de DNR intracelular

## 6.3.- COMPARACION ENTRE CELULAS CON Y SIN FENOTIPO MDR

Con el objetivo de comprobar que el procedimiento citométrico desarrollado para el estudio de la cinética de incorporación de DNR en las células 3T3 es suficientemente sensible para evidenciar la existencia del fenómeno MDR en las células 3T3-*mdr1* se realizan estudios de incorporación de DNR de forma paralela en los dos tipos celulares. La comparación entre las curvas que se obtengan en ambos tipos celulares nos permite valorar las diferencias que existen entre las cinéticas de incorporación de DNR en relación con el tipo celular

## 6.4.- MODULACION DE MDR CON VERAPAMILO

Con el fin de valorar si P-gp 170 puede ser inhibida y si nuestro modelo es capaz de evidenciarlo, realizamos estudios de incorporación añadiendo una droga moduladora bien conocida como verapamilo. En este experimento se comparan las curvas de incorporación de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* en presencia o no de modulador.

Para optimizar el experimento fue necesario determinar previamente el tiempo de incubación con el modulador necesario para ejercer su acción así como la concentración óptima para inhibir P-gp 170. Para ello, y partiendo de las observaciones de otros autores, se realizaron estudios en paralelo utilizando diferentes concentraciones de VRP y realizando tiempos escalados de incubación.

A continuación desarrollamos el experimento para la valoración de la concentración óptima de VRP.

1 - Las células 3T3-*mdr1* en suspensión se dispensan en 5 tubos ( $0.5 \times 10^6$  céls por tubo) convenientemente rotulados (sin VRP, con VRP 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M). Lo mismo se hace con las células 3T3. El volumen de la muestra celular varía en cada tubo según la concentración de VRP que le corresponde (1000  $\mu$ l, 990  $\mu$ l, 950  $\mu$ l, 900  $\mu$ l y 800  $\mu$ l respectivamente).

2 - Se añade en cada tubo la cantidad de solución de VRP necesaria para obtener las diferentes concentraciones (a partir de una solución madre 100  $\mu$ M) 0  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l respectivamente.

3 - Los tubos se incuban durante 15 minutos, a una temperatura constante de 37 °C y en la oscuridad.

4 - Se realiza una medida de fluorescencia basal.

5 - Se extraen 50  $\mu$ l de la suspensión celular, para ajustar la concentración de DNR.

6 - Se añaden a cada tubo 100  $\mu$ l de una solución madre de DNR a una concentración 20  $\mu$ M, lo que supone trabajar con una concentración de DNR 2  $\mu$ M en cada tubo.

7 - Se realizan medidas de fluorescencia a diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos), obteniéndose histogramas de fluorescencia en cada tiempo. A partir de sus valores medios se construyen curvas de cinética de incorporación de DNR para cada tipo celular y para cada concentración de modulador.

8 - A partir de estos resultados, comparando los niveles máximos de fluorescencia alcanzados por las células resistentes en presencia de las diferentes concentraciones de VRP con los niveles de ellas mismas sin modulador y con los niveles de las células

sensibles, se valora cuál es la concentración óptima de VRP que permite una modulación completa de P-gp 170

El experimento de valoración de tiempo de incubación se detalla a continuación

- 1 - Las células 3T3-*mdr1* en suspensión se dispensan en cinco tubos (900  $\mu$ l /  $0.5 \times 10^6$  células por tubo) convenientemente rotulados (sin VRP, VRP 10  $\mu$ M 0 minutos, VRP 10  $\mu$ M 15 minutos, VRP 10  $\mu$ M 30 minutos y VRP 10  $\mu$ M 60 minutos) Las células 3T3 se dispensan en un tubo sin VRP
- 2 - Se añaden 100  $\mu$ l de solución de VRP 100  $\mu$ M a los tubos señalados, mientras que a los negativos se les añade 100  $\mu$ l de medio (Concentración final de VRP en cada tubo 10  $\mu$ M)
- 3 - Se incuban durante 0,15, 30 y 60 minutos (cada tubo el tiempo correspondiente) a 37  $^{\circ}$ C
- 4 - Se realizan lecturas escaladas de fluorescencia basal
- 5 - Se extraen 50  $\mu$ l de la suspensión celular
- 6 - Se añaden 100  $\mu$ l de la solución de DNR 20  $\mu$ M Concentración final de DNR en cada tubo 2  $\mu$ M
- 7 - Se realizan medidas de fluorescencia a diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos), obteniéndose histogramas de fluorescencia en cada tiempo. A partir de sus valores medios se construyen las curvas de cinética de incorporación de DNR para cada tipo celular y para cada situación (en este caso para cada tiempo de incubación con el modulador)

Los resultados de estos experimentos previos muestran que la concentración óptima de VRP para ejercer su acción moduladora es 10  $\mu$ M y que es suficiente con 15 minutos de incubación

Con estos datos se realizan de forma repetida y en idénticas condiciones, experimentos de modulación con VRP

- 1 - Las células 3T3 en suspensión se dispensan en dos tubos (900  $\mu$ l /  $0.5 \times 10^6$  células por tubo) convenientemente rotulados (en presencia o no de VRP) Lo mismo se hace con las células 3T3-*mdr1*
- 2 - Se añaden 100  $\mu$ l de solución de la solución de VRP 100  $\mu$ M a los tubos señalados, mientras que a los negativos se les añade 100  $\mu$ l de medio Concentración final de VRP en cada tubo 10  $\mu$ M

- 3 - Se incuban durante 15 minutos a 37 °C
- 4 - Se realiza una lectura de fluorescencia basal
- 5 - Se extraen 50  $\mu$ l de la suspensión celular, para ajustar la concentración de DNR
- 6 - Se añaden 100  $\mu$ l de la solución de DNR 20  $\mu$ M. Concentración final de DNR en cada tubo 2  $\mu$ M
- 7 - Se realizan medidas de fluorescencia a diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos), obteniéndose histogramas de fluorescencia en cada tiempo. A partir de sus valores medios se construyen las curvas de cinética de incorporación de DNR para cada tipo celular

### **6.5.- ESTUDIOS DE EXPULSION DE FARMACOS**

Los estudios de expulsión se basan en valorar la capacidad celular de retención de la sustancia fluorescente tras lavar las células (eliminando el medio que contiene sustancia fluorescente) y resuspenderlas en medio carente de DNR, pero conteniendo la concentración de modulador que le corresponde a cada tubo. Estos estudios se realizan a continuación del estudio de incorporación, es decir partiendo de una concentración intracelular de fármaco fluorescente máxima para cada tipo celular.

El protocolo del estudio de expulsión se desarrolla a continuación:

- 1 - Al finalizar el estudio de incorporación (60 minutos) se añaden a cada tubo 2ml de medio (DMEM) a una temperatura de 4 °C (con la finalidad de detener la dinámica de entrada y salida del fármaco)
- 2 - Se realiza una centrifugación rápida (5 minutos / 2000 rpm)
- 3 - Se retira el sobrenadante
- 4 - El botón celular se resuspende en 800  $\mu$ l de medio a 37 °C libre de DNR pero conteniendo el fármaco modulador a la concentración adecuada (y en su caso sin modulador)
- 5 - Se realizan lecturas de fluorescencia de forma secuencial en varios tiempos: inmediato tras el lavado, 5 minutos, 10, 30, y 60 minutos
- 6 - Se realizan posteriormente curvas con los valores medios de los histogramas obtenidos en cada lectura, valorándose las diferencias entre las células salvajes y las transfectadas así como la acción del modulador sobre la capacidad de las células para retener el fármaco

## 6.6.- MODULACION DE MDR CON DIFERENTES DROGAS. PSC 833 Y TAMOXIFEN

Una vez validado el modelo con el uso de VRP, este modelo experimental puede aplicarse para el estudio de la actividad moduladora sobre P-gp 170 de otros fármacos como tamoxifeno y PSC 833. Para ello se realizan estudios previos que valoran las concentraciones mínimas de cada fármaco para ejercer la acción moduladora. Con esta información se realizan estudios de incorporación y expulsión en paralelo en las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, en presencia o no de la sustancia moduladora (metodológicamente idénticos a los realizados previamente con VRP). Todos los experimentos se realizan de forma paralela con VRP, que se considera control positivo de modulación.

### 6.6.1 - Experimento de valoración de la concentración óptima de PSC 833

El experimento con PSC 833 se realiza con diferentes soluciones madre para cada una de las concentraciones finales (20  $\mu\text{M}$  y 840  $\mu\text{M}$ )

1 - Las células 3T3-*mdr1* en suspensión se dispensan en 9 tubos ( $0.5 \times 10^6$  células por tubo) convenientemente rotulados (VRP 10  $\mu\text{M}$ , sin PSC 833, con PSC 833 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ). Lo mismo se hace con las células 3T3. El volumen de la muestra celular varía en cada tubo según la concentración de PSC 833 (1000  $\mu\text{l}$ , 995  $\mu\text{l}$ , 990  $\mu\text{l}$ , 975  $\mu\text{l}$ , 950  $\mu\text{l}$ , 996  $\mu\text{l}$ , 991  $\mu\text{l}$  y 958  $\mu\text{l}$  respectivamente) y de VRP que le corresponde (900  $\mu\text{l}$ )

2 - Se añade en cada tubo la cantidad de solución de PSC 833 necesaria para obtener las diferentes concentraciones. A partir de una solución madre 20  $\mu\text{M}$ : 0  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$ . A partir de una solución madre 840  $\mu\text{M}$ : 4  $\mu\text{l}$ , 8  $\mu\text{l}$  y 42  $\mu\text{l}$  respectivamente. Así mismo, en el tubo correspondiente se añaden 100  $\mu\text{l}$  de VRP (solución madre 100  $\mu\text{M}$ )

3 - Los tubos se incuban durante 15 minutos, a una temperatura constante de 37 °C y en la oscuridad.

4 - Se realiza una medida de fluorescencia basal.

5 - Se extraen 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular, para ajustar la concentración de DNR.

6 - Se añaden a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de una solución de DNR 20  $\mu\text{M}$  para obtener una concentración final de DNR en el tubo 2  $\mu\text{M}$ .

7 - Se realizan medidas de fluorescencia a diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos), obteniéndose histogramas de fluorescencia en cada tiempo. A partir

de sus valores medios se construyen las curvas de cinética de incorporación de DNR para cada tipo celular y para cada concentración de modulador.

8.- A partir de estos resultados, comparando los niveles máximos de fluorescencia alcanzados por las células resistentes en presencia de las diferentes concentraciones de PSC 833 con los niveles de ellas mismas sin modulador y con VRP, así como con los niveles de las células sensibles, se valora cuál es la concentración de PSC 833 que permite una modulación completa de P-gp 170. En caso que los rangos de concentración del modulador no consigan modular o que con PSC 833 0.1  $\mu\text{M}$  ya se consiga la modulación completa se repiten los experimentos con un reajuste a la alza o baja de las concentraciones del modulador. Si la concentración es tan elevada que resulta en un decremento de la viabilidad celular se considera que el modulador no es eficaz.

#### 6.6.2.- Experimento de valoración de la concentración óptima de Tamoxifeno (TMX)

1.- Las células 3T3-*mdr1* en suspensión se dispensan en 6 tubos ( $0.5 \times 10^6$  células por tubo) convenientemente rotulados (VRP 10  $\mu\text{M}$ , sin TMX, con TMX 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ ). Lo mismo se hace con las células 3T3.

El volumen de la muestra celular varía en cada tubo según la concentración de TMX que le corresponde (1000  $\mu\text{l}$ , 980  $\mu\text{l}$ , 940  $\mu\text{l}$ , 880  $\mu\text{l}$ , 800  $\mu\text{l}$  y 600  $\mu\text{l}$  respectivamente) y de VRP (900  $\mu\text{l}$ ).

2.- Se añade en cada tubo la cantidad de solución de TMX necesaria para obtener las diferentes concentraciones (a partir de una solución madre 200  $\mu\text{M}$ ): 0  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 60  $\mu\text{l}$ , 120  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  y 400  $\mu\text{l}$  respectivamente. En el tubo correspondiente se añaden 100  $\mu\text{l}$  de VRP de una solución 100  $\mu\text{M}$ .

3.- Los tubos se incuban durante 15 minutos a una temperatura constante de 37 °C y en la oscuridad.

4.- Se realiza una medida de fluorescencia basal.

5.- Se extraen 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular, para ajustar la concentración de DNR.

6.- Se añadirá a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de una solución de DNR 20  $\mu\text{M}$  para obtener una concentración final de DNR en el tubo: 2  $\mu\text{M}$

7.- Se realizan medidas de fluorescencia a diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos), obteniéndose histogramas de fluorescencia en cada tiempo. A partir de sus valores medios se construyen las curvas de cinética de incorporación de DNR para cada tipo celular y para cada concentración de modulador.

8.- A partir de estos resultados, comparando los niveles máximos de fluorescencia alcanzados por las células resistentes en presencia de las diferentes concentraciones de TMX con los niveles de ellas mismas sin modulador y con VRP así como con los niveles de las células sensibles, se valora cuál es la concentración de TMX que permite una modulación completa de P-gp 170.

En caso de que los rangos de concentración del modulador no consigan la modulación o que con TMX 10  $\mu\text{M}$  ya se consiga la modulación completa se repiten los experimentos con un reajuste a la alza o baja de las concentraciones del modulador. Si la concentración es tan elevada que resulta en un decremento de la viabilidad celular se considera que el modulador no es eficaz.

#### 6.6.3. Experimentos de incorporación y expulsión

Una vez obtenidas las concentraciones adecuadas de cada uno de los fármacos moduladores se realizan los experimentos de incorporación y de expulsión en paralelo y con VRP con el fin de comparar su actividad moduladora sobre P-gp 170 en idénticas condiciones. El experimento se realiza también en las células sensibles, lo que permitirá valorar la acción moduladora y descartar acciones inespecíficas de los fármacos a estudio.

1.- Las células 3T3-*mdr1* se dispensan en varios tubos convenientemente rotulados según el modulador asignado ( $0.5 \times 10^6$  células por tubo). Se utiliza un tubo sin modulador como control negativo de modulación y un tubo con VRP 10  $\mu\text{M}$  como control positivo de modulación. Lo mismo se hace con las células 3T3.

2.- Se añade en cada tubo el modulador asignado, en una cantidad correspondiente a la concentración elegida en experimentos previos.

3.- Se realiza una incubación de 15 minutos a 37 °C y en la oscuridad.

4.- Se realiza una medida basal de fluorescencia.

5.- Se extraen 50  $\mu\text{l}$  de la muestra para ajustar la concentración de DNR.

6.- Se añaden a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de una solución de DNR 20  $\mu\text{M}$  para obtener una concentración final de DNR en el tubo: 2  $\mu\text{M}$

7.- Se realizan medidas de fluorescencia a diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos) obteniéndose histogramas de fluorescencia en cada tiempo. A partir de sus valores medios se construyen las curvas de cinética de incorporación de DNR para cada tipo celular y para cada concentración de modulador.

- 8.- Se añaden 900  $\mu\text{l}$  de medio (DMEM) a una temperatura de 4°C a cada tubo y se realiza una centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos.
- 9.- Se retira el sobrenadante y se añaden 800  $\mu\text{l}$  de medio a 37 °C libre de DNR, y conteniendo la concentración correspondiente de modulador (o en su caso, sin modulador).
- 10.- Se realizan medidas de fluorescencia secuenciales en diferentes tiempos predeterminados (inmediato, 10, 30 y 60 minutos) para valorar la salida de DNR del interior celular hacia un medio extracelular libre de DNR (experimento de expulsión).

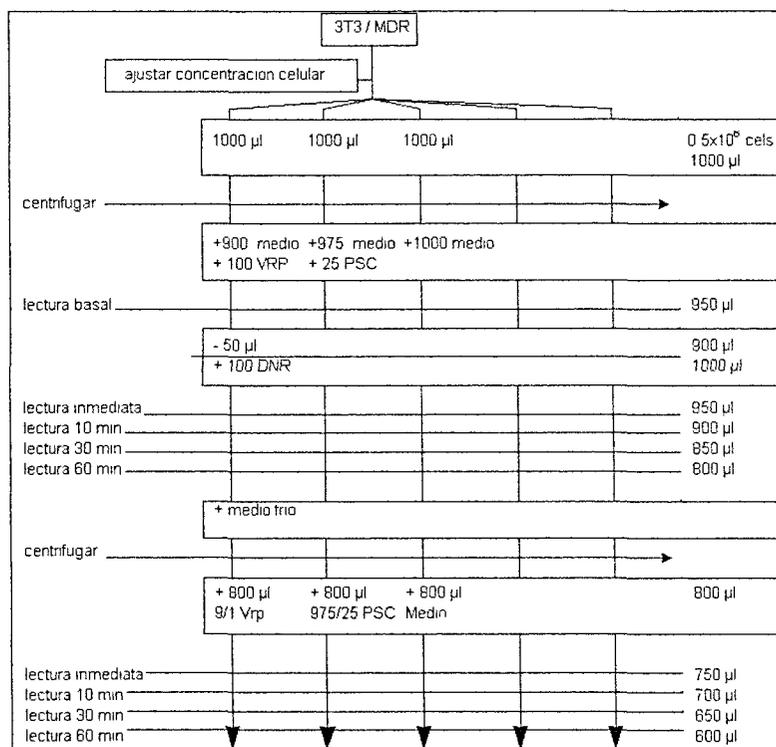


Figura 5: Esquema del proceso de un experimento de incorporación y expulsión. En este caso se desarrolla un experimento realizado con PSC 833 y VRP.

En el experimento de incorporación se comparan los niveles de fluorescencia (canal de LFL3) alcanzados en el equilibrio (60 minutos) por las células resistentes en presencia de los diferentes fármacos moduladores a estudio con los alcanzados por ellas mismas en presencia de los moduladores control y en ausencia de modulador así como con los niveles de las células sensibles. En el experimento de expulsión se valora la capacidad de las células para retener la DNR (porcentaje de expulsión de DNR) en presencia o ausencia de los diferentes moduladores. Se realizan comparaciones entre los diferentes moduladores y también entre las células resistentes y sensibles.

A partir de estos resultados se valora si los fármacos a estudio son capaces de modular P-gp 170 de una forma similar al modulador control VRP (reversión completa del fenómeno MDR) o estimar el grado de inhibición parcial de la bomba.

## 7.- RECOGIDA DE DATOS Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

### 7.1.- VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables que se han considerado en el presente trabajo son las siguientes

7.1.1 - Variables de identificación del experimento a cada experimento se le ha asignado un número de identificación y de cada uno de ellos se ha registrado la fecha de realización y las posibles incidencias durante el mismo

7.1.2 - Tipo celular variable cualitativa que identifica el tipo celular del que se obtienen los resultados de las lecturas citométricas en las diferentes condiciones experimentales. Las categorías son dos y corresponden a

- Células NIH 3T3 o controles negativos de P-gp 170
- Células NIH 3T3-*mdr1* transfectadas con el gen *mdr1* (que presentan el fenotipo MDR)

7.1.3 - Modulador variable cualitativa que identifica la condición experimental respecto a la ausencia de modulador, la presencia de un fármaco de reconocida capacidad moduladora del fenómeno MDR como es verapamilo (control positivo de modulación), y la presencia de fármacos con posible acción moduladora (fármacos objeto de estudio). En este mismo apartado se consignó la concentración empleada de los fármacos. Las categorías consideradas fueron las siguientes

- Ausencia de modulador
- Verapamilo a diferentes concentraciones (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M)
- PSC 833 a diferentes concentraciones (0,1  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M)
- Tamoxifeno a diferentes concentraciones (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M)

Después de los experimentos de incorporación iniciales para determinar la concentración mínima eficaz con capacidad moduladora de la bomba, las condiciones experimentales consideradas son

- Ausencia de modulador
- Verapamilo a una concentración final 10  $\mu$ M
- PSC 833 a una concentración final 0,5  $\mu$ M
- Combinaciones de fármacos (PSC 833 0,1  $\mu$ M + tamoxifeno 50  $\mu$ M)

7.1.4 - Canal de fluorescencia variable cuantitativa expresada como canal medio del histograma de LFL3. Este valor es proporcionado directamente por el software del citómetro y se expresa en unidades arbitrarias. Esta variable se ha recogido para cada una de los siguientes tiempos de lectura en los experimentos

- basal o previo a DNR,
- inmediato post-DNR (incorporación)
- 10 minutos (incorporación)
- 30 minutos (incorporación)
- 60 minutos (incorporación)
- inmediato post-lavado (expulsión)
- 10 minutos (expulsión)
- 30 minutos (expulsión)
- 60 minutos (expulsión)

7.1.5 - Porcentaje de expulsión variable cuantitativa cuyo valor que se obtiene de la comparación entre la fluorescencia intracelular tras los 60 minutos del lavado y la fluorescencia máxima de la incorporación. La fórmula para la obtención de esta variable es la siguiente

$$\frac{(\text{canal LFL3 60 minutos incorporación}) - (\text{canal LFL3 60 minutos expulsión})}{\text{canal LFL3 a los 60 minutos de incorporación}}$$

7.1.6 - Porcentaje de células que incorporan yoduro de propidio mortalidad celular. Variable cuantitativa que define el porcentaje de células no viables de la muestra estudiada.

Estos datos son transcritos a una base de datos informatizada y a partir de ellos se realizan los estudios estadísticos y se construyen las gráficas de las cinéticas de incorporación y expulsión.

## 7.2. COMPARACIONES ESTADÍSTICAS

Para conseguir los objetivos planteados y la comprobación de las hipótesis del estudio se han realizado los siguientes estudios estadísticos

- Comparación de los canales de LFL3 a los 60 minutos tras la incubación (incorporación de DNR) entre las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, en las siguientes condiciones experimentales

sin modulador, en presencia de VRP, PSC 833, TMX y combinaciones de PSC 833 y TMX.

- Comparación de los porcentaje de expulsión DNR a los 60 minutos tras el lavado (expulsión) entre las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, en las siguientes condiciones experimentales: sin modulador, en presencia de VRP, PSC 833, TMX y combinaciones de PSC 833 y TMX.

Se ha considerado que los fármacos a estudio (PSC 833, TMX y combinaciones) consiguen una modulación completa de la acción expulsora de DNR por parte de P-gp 170 cuando no se han encontrado diferencias significativas entre los niveles de LFL3 conseguidos por estos fármacos y los conseguidos por VRP en las diferentes condiciones experimentales en las células 3T3-*mdr1*. Además, no deben existir diferencias significativas entre los resultados de las células 3T3-*mdr1* con modulador y las células 3T3.

Un aumento en los niveles de LFL3 en las células 3T3-*mdr1* que no cumple las condiciones anteriores se ha considerado una modulación parcial.

Para las comparaciones se emplean las pruebas siguientes: t de Student y/o análisis de la varianza (se realiza la estimación con IC al 95 % de las diferencias entre las variables). Previamente a la aplicación de las pruebas estadísticas paramétricas se ha comprobado la normalidad de las distribuciones de todas las variables utilizadas (método de Kolmogorov-Smirnov).

Las comparaciones estadísticas se han realizado de forma distinta en los experimentos de incorporación y de expulsión:

- En los experimentos de incorporación, dado que no existen diferencias en los niveles de fluorescencia basales en ambos tipos de células, las comparaciones de las cinéticas de incorporación se han realizado empleando los valores de fluorescencia en el equilibrio de incorporación (60 min post- incubación con DNR).
- En los experimentos de expulsión, dado que el nivel de fluorescencia del que se parte es diferente en cada tipo y situación celular, se ha valorado el “porcentaje de expulsión”, puesto que se ha considerado que esta variable describe mejor el fenómeno de la expulsión de los fármacos mediada por P-gp 170).

## RESULTADOS

## VI.- RESULTADOS

### 1.- ESTUDIO DE LA EXPRESION DE P-gp 170 EN LAS CELULAS DEL MODELO

Los resultados del estudio de la expresión de P-gp 170 en las células de nuestro modelo, mediante la utilización del anticuerpo monoclonal 4E3 (Arceci *et al*, 1992) son los que se muestran a continuación

En la tabla se muestra el valor medio y la desviación standard (SD) de los histogramas de distribución de canales de LFL3 en diferentes experimentos, en las células transfectadas y sensibles

expresión de P-gp 170	3T3- <i>mdr1</i>		3T3	
	canal LFL3	SD LFL3	canal LFL3	SD LFL3
1° experimento	5280	4899	264	187
2° experimento	5093	4556	211	139

Tabla 2 Expresión de P-gp 170 en células 3T3-*mdr1* y 3T3

Los resultados obtenidos muestran claramente la ausencia de positividad para 4E3, y por lo tanto la ausencia de P-gp 170 en la membrana de las células 3T3

Las células 3T3-*mdr1* expresan una alta positividad para 4E3 (20-24 veces más intensa que las sensibles), lo que demuestra la presencia de P-gp 170 en su membrana

Estos experimentos se han realizado repetidamente durante el tiempo en que se ha desarrollado el experimento, para asegurar, en las células resistentes, una estabilidad en la positividad para P-gp 170

## 2.- ESTUDIO DE LA FUNCION DE P-gp 170

### 2.1.- Estudio de la cinética de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3.

Los resultados de los experimentos de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3 son los que se muestran a continuación.

En la tabla aparecen los valores de los canales medios de LFL3 con relación al tiempo y condiciones de incubación en cada uno de los experimentos realizados.

A partir de los valores de la tabla se construyen las curvas de cinética de incorporación y expulsión en las células.

Exp	incorporación (3T3)					expulsión (3T3)			
	basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
1	107	132	4902	6932	8156	8973	7744	6705	5938
2	107	145	4866	7243	8111	8836	7476	6722	5678
3	107	148	4685	6747	7085	6937	6046	5013	4136
4	107	147	4615	6238	6785	6862	6090	5191	4377
5	106	145	4746	6331	7057	7205	6029	5120	4423
6	107	135	4593	6420	6713	6926	5976	4878	4188
7	108	199	4597	8578	10140	9949	8491	7663	7038
8	107	186	4774	8352	10110	9613	8498	7559	7076
9	107	162	4542	6194	7001	6805	5934	5386	5035
10	107	313	4756	6807	7312	7249	6059	5512	5301
11	106	192	3753	6222	7597	7101	6650	5706	5362
12	106	151	4197	7058	8500	7554	6874	6118	5390
13	106	165	4860	7451	8024	7640	6797	5830	5345
14	106	174	3387	5320	5772	5373	4878	4654	4372
15	107	151	5043	7855	9254	8739	7631	7117	6222
16	107	137	5029	7920	9085	9076	7987	7246	6058
17	107	127	4709	7611	9228	8796	7765	7166	5838
18	107	143	5063	8156	9113	9574	8324	7719	6477

Tabla 3: Resultados de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3

### 2.2.- Estudio de la cinética de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3-*mdr1*.

Los resultados de los experimentos de incorporación y expulsión de DNR realizados en las células 3T3-*mdr1* son los que se muestran a continuación.

En la tabla siguiente aparecen los valores medios de LFL3 en relación al tiempo y condiciones de incubación en cada uno de los experimentos realizados.

A partir de los valores de la tabla se construyen las curvas de las cinéticas de incorporación y expulsión en las células.

exp	incorporación (3T3- <i>mdr1</i> )					expulsión (3T3- <i>mdr1</i> )			
	basal	1 min	10 min	30 min	60 min	1 min	10 min	30 min	60 min
1	106	114	500	604	659	377	171	138	127
2	106	119	517	613	675	384	168	138	125
3	107	118	383	466	511	299	153	131	119
4	106	121	383	443	486	260	151	126	118
5	107	123	390	454	498	259	154	128	119
6	107	119	373	430	450	244	145	124	116
7	108	133	501	736	866	483	291	207	162
8	106	147	556	822	1000	575	336	227	169
9	106	131	481	572	701	368	176	145	133
10	106	128	438	549	655	338	174	141	131
11	107	119	435	681	692	577	453	276	180
12	107	120	399	648	815	506	404	243	170
13	106	126	359	455	517	252	162	130	123
14	106	138	709	923	976	758	486	291	248
15	106	113	392	479	520	385	185	139	119
16	106	112	399	489	549	381	179	138	117
17	107	113	329	422	436	334	167	130	116
18	106	114	395	492	601	365	183	135	118

Tabla 4: Resultados de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3-*mdr1*

### 2.3.- Comparación entre las cinéticas de incorporación y expulsión de las células 3T3 y 3T3-*mdr1*.

Con el objetivo de demostrar la presencia y funcionalidad de P-gp 170 en las células 3T3-*mdr1* hemos comparado en el momento del equilibrio (60 minutos post incubación) la distribución de valores de los canales de LFL3 de las curvas de las cinéticas celulares de incorporación y expulsión entre las células 3T3 y 3T3-*mdr1*, en los experimentos realizados.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los estudios de incorporación, en las células transfectadas y control:

Tipo celular	incorporación (medida a los 60 minutos)						
	n	canal LFL3 (UA)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	18	8057.9	1241.7	8067.5	5772	10140	7484.3-8631.5
3T3- <i>mdr1</i>	18	645.2	173.9	628.0	436	1006	564.88-725.52

Tabla 5: Resultados de incorporación de DNR en ambos tipos celulares

El valor medio de los canales de LFL3, en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos, en las células 3T3-*mdr1* es significativamente inferior al de las células 3T3 ( $p < 0,0005$ ). La diferencia media de cantidad de fluorescencia entre ambos tipos celulares es de 7412.8 UA y el IC 95 % de la diferencia es de 6791,7 a 8033,8 UA.

Es decir, las células sensibles acumulan aproximadamente 12 veces más DNR que las resistentes.

En la siguiente gráfica se muestran las curvas de cinética de incorporación y expulsión en las células 3T3 y en las células 3T3-*mdr1*, obtenidas a partir de los valores expuestos en las tablas anteriores:

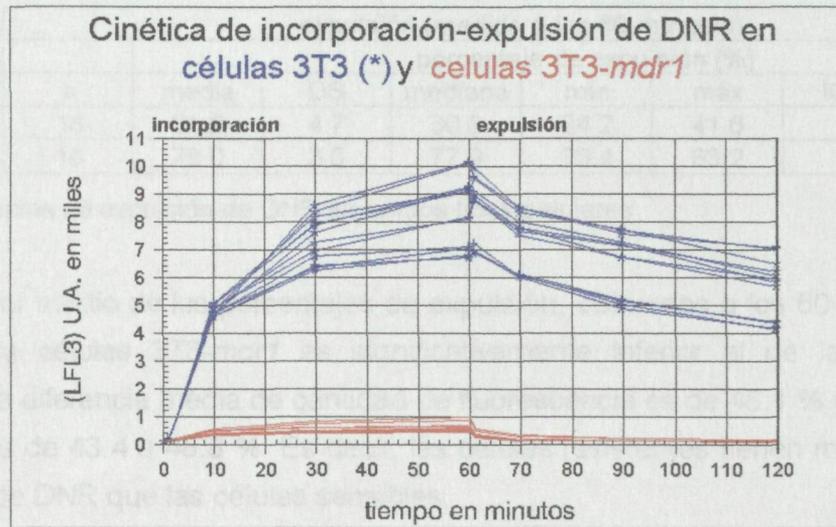


Figura 6: Gráfica en la que se muestran las curvas de cinética de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* en ausencia de modulador.

Se muestra un ejemplo de un experimento de incorporación que se realizó con una mezcla de células 3T3 y 3T3-*mdr1* en el que se observa una clara diferencia entre las cinéticas de las células sensibles y resistentes:

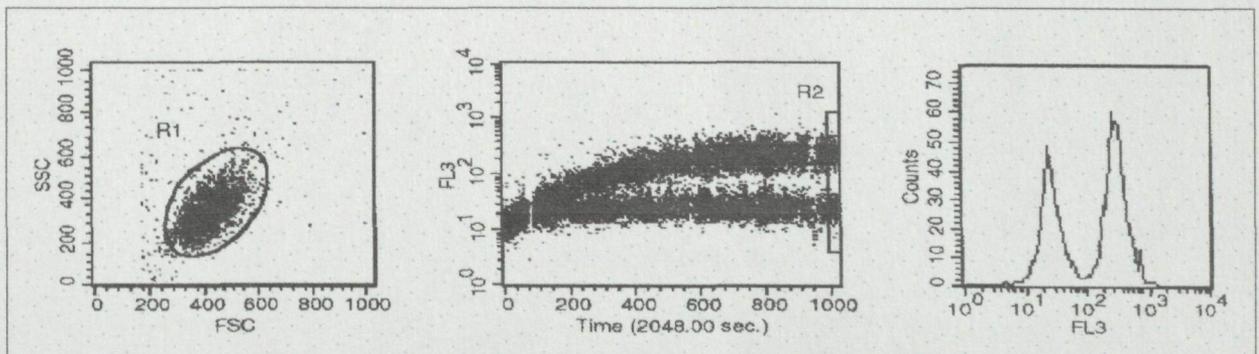


Figura 7: En la figura de la izquierda se muestra la población de fibroblastos, homogénea en cuanto a características de FSC y SSC. En la figura central se muestra una gráfica de cinética de incorporación de adquisición continua, en la que se observa claramente la diferencia entre las cinéticas de las células sensibles (curva inferior) y resistentes (curva superior). En la figura de la derecha se muestran los histogramas obtenidos a los 60 minutos de la incorporación.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los estudios de expulsión en las células 3T3 y 3T3-*mdr1*. El parámetro utilizado para la comparación entre los diferentes experimentos de expulsión es el "porcentaje de expulsión", que se refiere a la diferencia entre los niveles de fluorescencia máximos alcanzados a los 60 minutos en el experimento de incorporación y los niveles de fluorescencia a los 60 minutos tras el lavado:

Tipo celular	expulsión (medida a los 60 minutos)						
	n	porcentaje de expulsión (%)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	18	31.9	4.7	30.3	24.2	41.6	29.70-34.09
3T3- <i>mdr1</i>	18	78.0	3.0	77.9	73.4	83.2	76.60-79.39

Tabla 6: Resultados de expulsión de DNR en ambos tipos celulares

El valor medio de los porcentajes de expulsión, obtenidos a los 60 minutos tras el lavado, en las células 3T3-*mdr1* es significativamente inferior al de las células 3T3 ( $p < 0,0005$ ). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 46.1 % y el IC 95 % de la diferencia es de 43.4 a 48.8 %. Es decir, las células resistentes tienen mayor capacidad de expulsión de DNR que las células sensibles.

### 3.- ESTUDIO DE MODULACION CON VERAPAMILO

#### 3.1.- Experimentos para valoración de concentración y tiempo de incubación.

En la siguiente tabla y gráfica se muestran los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3-*mdr1* en relación con el tiempo y las diferentes concentraciones de VRP, en un experimento de incorporación.

Se muestran también los valores en las células 3T3 sin modulador (nivel de referencia para valorar la capacidad moduladora de VRP). La notación MDR hace referencia a las células 3T3-*mdr1*.

	Basal	inmediato	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3T3 sin VRP	114	549	8244	13170	14400
3T3- <i>mdr1</i> sin VRP	110	245	1001	1468	1764
3T3- <i>mdr1</i> VRP 1 $\mu$ M	110	209	4755	7377	8599
3T3- <i>mdr1</i> VRP 5 $\mu$ M	111	273	6792	11380	13710
3T3- <i>mdr1</i> VRP 10 $\mu$ M	109	418	7674	12530	15170
3T3- <i>mdr1</i> VRP 20 $\mu$ M	109	298	7247	12310	15320

Tabla 7: Resultados de la incorporación de DNR en células transfectadas en presencia de diferentes concentraciones de VRP

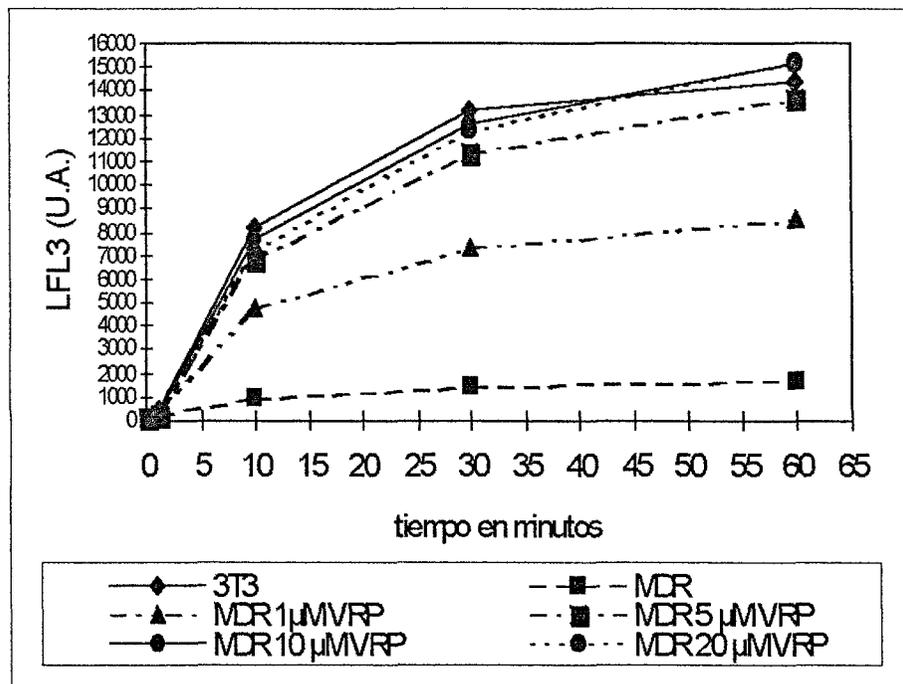


Figura 8: En la gráfica se observan las curvas de cinética de incorporación de DNR en las células 3T3-*mdr1* en presencia de diferentes concentraciones de VRP. Como control positivo de modulación se muestra la curva de las células sensibles (3T3).

En la siguiente tabla y gráfica se muestran los valores medios de LFL3 (estudio realizado con RH 123) en las células 3T3-*mdr1* en relación diferentes tiempos de incubación con VRP, a una dosis fija predeterminada (10  $\mu$ M VRP), en un experimento de incorporación.

La notación MDR hace referencia a las células 3T3-*mdr1*.

	Basal	inmediato	10 minutos	30 minutos	60 minutos
3T3 sin VRP	22	442	1485	2090	2583
3T3- <i>mdr1</i> sin VRP	22	544	625	652	692
3T3- <i>mdr1</i> VRP 10 $\mu$ M 0 m.	22	489	1250	2617	2053
3T3- <i>mdr1</i> VRP 10 $\mu$ M 15 m.	24	536	1676	2370	2598
3T3- <i>mdr1</i> VRP 10 $\mu$ M 30 m.	22	550	1788	2463	2602
3T3- <i>mdr1</i> VRP 10 $\mu$ M 60 m.	23	576	1755	2312	2777

Tabla 8: Resultados de incorporación de DNR en células transfectadas incubadas con VRP en distintos periodos de tiempo.

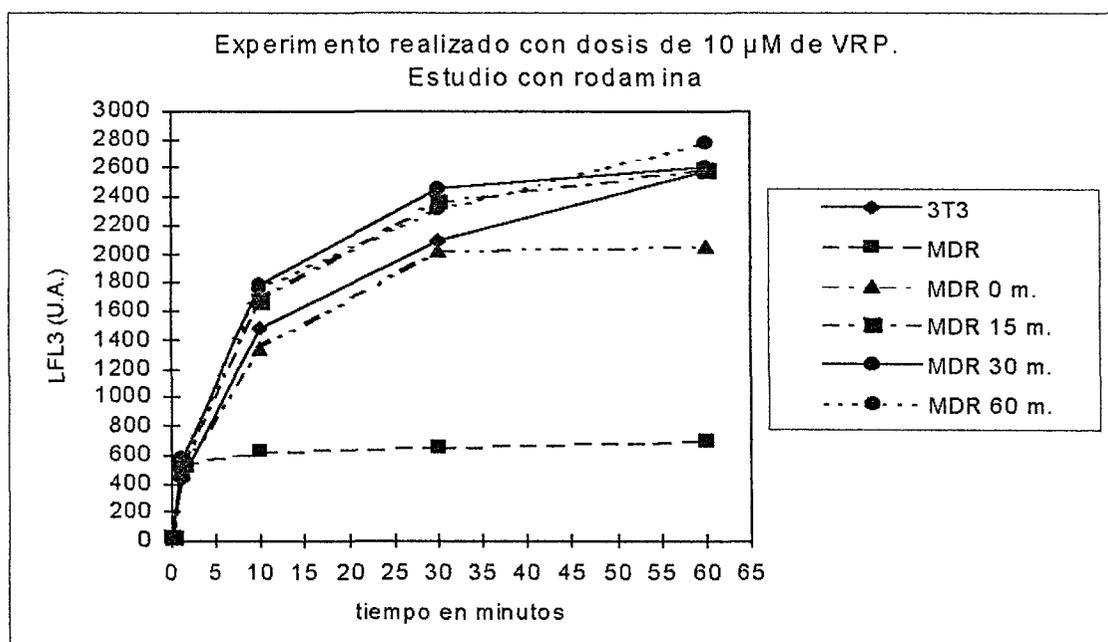


Figura 9: En la gráfica se muestran las curvas de cinética de incorporación de RH 123 en las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP 10 $\mu$ M, en diferentes tiempos de incubación.

### 3.2.- Estudio de cinética de incorporación y expulsión de las células 3T3 en presencia de VRP.

En la tabla que aparece a continuación se exponen los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3 incubadas con VRP 10  $\mu$ M, en los diferentes tiempos y condiciones de estudio.

exp	incorporación (3T3 / VRP 10 $\mu$ M)					expulsión (3T3 / VRP 10 $\mu$ M)			
	basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
1	107	141	4965	7138	8860	9746	8355	7379	6354
2	107	132	5027	7301	8260	8450	7615	6879	5911
3	107	148	4849	7004	7883	7935	6848	6089	4977
4	107	159	5164	7191	7654	7697	7226	6125	5431
5	106	147	5110	6924	7600	7826	7025	5945	5302
6	107	157	5081	7143	7750	8011	6992	6024	5192
7	109	183	4380	9308	10600	10060	9323	8410	8059
8	109	184	4584	8712	10750	10230	9217	8387	7966
9	108	170	4606	7105	8076	7959	6689	5957	5533
10	107	176	4568	6856	800018	7625	6578	6018	5813
11	107	141	4315	7695	9962	9938	9161	8182	7370
12	107	153	4485	7820	9703	9446	8950	7838	6738
13	107	180	4760	7282	8218	7987	7173	6500	6100
14	106	142	3880	5827	6306	6223	5873	5581	5187

Tabla 9: Resultados de incorporación y expulsión de DNR en células 3T3 con VRP 10  $\mu$ M

### 3.3.- Estudio de cinética de incorporación y expulsión de las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP.

En la siguiente tabla se muestran los valores medios de LFL3 (DNR) en las células 3T3-*mdr1* incubadas con VRP 10  $\mu$ M, en los diferentes tiempos y condiciones de estudio.

exp	incorporación (3T3- <i>mdr1</i> / VRP 10 $\mu$ M)					expulsión (3T3- <i>mdr1</i> / VRP 10 $\mu$ M)			
	basal	inmediato	10 min	30 min	60 min	inmediato	10 min	30 min	60 min
1	106	135	5249	7116	7484	8094	6364	5365	4656
2	106	143	5407	7325	7765	8268	6685	5690	4678
3	107	164	5258	7201	7595	7813	6404	5367	4818
4	107	145	4657	6372	6815	6893	5899	4766	3959
5	107	146	4901	6513	7097	7204	6317	5141	4440
6	106	147	4939	6882	7271	7673	6477	5289	4339
7	107	180	4343	7617	9225	9021	7827	7031	6580
8	106	165	4388	7686	9429	8884	7707	7047	6619
9	106	167	3959	6047	7090	6413	5482	5004	4884
10	107	176	4568	6856	8018	7625	6578	6018	5813
11	107	149	4757	7427	7913	7704	6908	6032	5465
12	107	139	4186	6602	7392	6638	6156	5213	4587
13	106	150	3781	5699	6399	5907	5169	4507	4347
14	107	184	3619	4898	5024	4902	4524	4250	4116

Tabla 10: Resultados de incorporación y expulsión de DNR en células 3T3-*mdr1* con VRP

En la siguiente gráfica se muestran las curvas de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* incubadas con VRP 10  $\mu$ M. Los valores utilizados son los que han sido expuesto en las tablas anteriores.

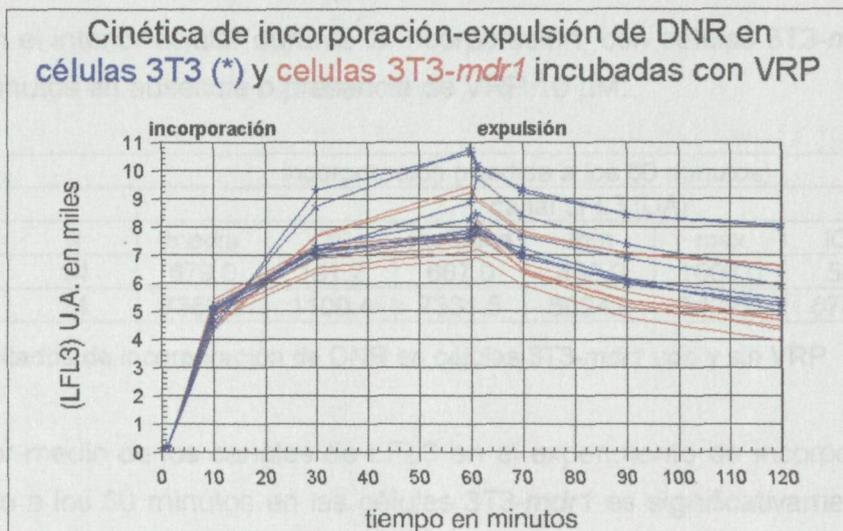


Figura 10: En la gráfica se muestran las curvas de cinética de incorporación y expulsión de DNR en las células 3T3 y en las células 3T3-*mdr1* incubadas con VRP 10  $\mu$ M

### 3.4.-Resultados de los estudios de incorporación.

**3.4.1- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3 en presencia o no de VRP.** Se ha comparado en el momento del equilibrio (60 minutos), la distribución de los canales medios de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR acumulada en el interior celular durante la incorporación, con células 3T3 incubadas durante 15 minutos en ausencia o presencia de VRP 10  $\mu$ M:

Tipo celular	n	incorporación (medida a los 60 minutos)					IC 95 % media
		media	DS	mediana	mín	máx	
3T3	14	7740.2	1235.1	7454.5	5772	10140	7093.22-8387.18
3T3+VRP	14	8545.7	1270.6	8147.0	6306.0	10750	7880.1-92113

Tabla 11: Resultados de incorporación de DNR en células 3T3 en presencia o no de VRP

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos en las células 3T3 no es significativamente diferente al de las células 3T3+VRP ( $p=0.1010$ ).

La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 805.5 UA, y el IC 95 % de la diferencia es de -168.2 a 1779.2 UA. Es decir, VRP no induce un mayor acumulo de DNR en las células 3T3.

**3.4.2.- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3-*mdr1* en presencia o no de VRP.** Se ha comparado en el momento del equilibrio (60 minutos), la distribución de los canales medios de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR

acumulada en el interior celular durante la incorporación, con células 3T3-*mdr1* incubadas durante 15 minutos en ausencia o presencia de VRP 10  $\mu$ M

		incorporación (medida a los 60 minutos)					
		canal LFL3 (UA)					
Tipo celular	n	media	DS	mediana	min	max	IC 95 % media
MDR	14	679 0	181 2	667 0	450 0	1006 0	584 05-773 95
MDR+VRP	14	7362 0	1100 4	7331 5	5024 0	9429 0	6785 56-7938 44

Tabla 12 Resultados de incorporación de DNR en células 3T3-*mdr1* con y sin VRP

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1*+VRP ( $p=0.0005$ )

La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 6683.4 UA, y el IC 95 % de la diferencia es de 6044.0 a 7322.9 UA. Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con VRP induce un mayor acumulo de DNR (en comparación de las mismas células sin modulador)

**3.4.3.- Comparación entre las cinéticas de incorporación de las células 3T3 en ausencia de modulador y las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP.** Se ha comparado en el momento del equilibrio (60 minutos), la distribución de los canales medios de LFL3, que reflejan la cantidad de DNR acumulada en el interior celular durante la incorporación, entre los experimentos de los que se dispone información, con células 3T3 en ausencia de modulador y células 3T3-*mdr1* incubadas con VRP 10  $\mu$ M

		incorporación (medida a los 60 minutos)					
		canal LFL3 (UA)					
Tipo celular	n	media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	14	7740 2	1235 1	7454 5	5772	10140	7093 22-8387 18
MDR+VRP	14	7362	1100 4	7331 5	5024 0	9429 0	6785 5-7938 44

Tabla 13 Resultados de incorporación de DNR en células 3T3 y 3T3-*mdr1* con VRP

El valor medio de los canales de LFL3 en el experimento de incorporación medido en el equilibrio a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1*+VRP no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ( $p=0.4010$ ). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 377.7 UA, y el IC 95 % de la diferencia es de -531.3 a 1286.7. Es decir, la incubación de las células 3T3-*mdr1* con VRP consigue aumentar la cantidad de fluorescencia intracelular, y por tanto la concentración de DNR, hasta niveles similares a los alcanzados por las células 3T3 sin modulador (parámetro considerado por nosotros para considerar una modulación completa del fenómeno MDR)

### 3.5.- Resultados de los estudios de expulsión

**3.5.1.- Comparación entre las cinéticas de expulsión de las células 3T3 en presencia o no de VRP.** Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR entre las células 3T3 en presencia o no de VRP 10  $\mu$ M

Tipo celular	expulsión (medida a los 60 minutos)						
	n	porcentaje de expulsión (%)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
3T3	14	32.0	4.98	30.3	24.2	41.6	29.39-34.60
3T3+VRP	14	29.3	3.56	28.7	23.9	36.8	27.43-31.16

Tabla 14 Resultados de la expulsión de DNR en las células 3T3 y 3T3 en presencia de VRP

El valor medio de los porcentajes de expulsión medidos 60 minutos en las células 3T3 no es significativamente diferente al de las células 3T3+VRP ( $p=0.1070$ ). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 2.73 %, y el IC 95 % de la diferencia es de -0.63 a 6.10 %. Es decir la expulsión de DNR en las células 3T3 no se modifica en presencia de VRP.

**3.5.2.- Comparación entre las cinéticas de expulsión de las células 3T3-*mdr1* en presencia o no de VRP.** Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR en las células 3T3-*mdr1* en presencia o no de VRP 10  $\mu$ M

Tipo celular	expulsión (medida a los 60 minutos)						
	n	porcentaje de expulsión (%)					
		media	DS	mediana	mín	máx	IC 95 % media
MDR	14	78.2	3.12	77.9	73.9	83.2	76.56-79.83
MDR+VRP	14	33.8	6.2	34.3	18.0	41.9	30.51-37.08

Tabla 15 Resultados de expulsión de DNR en las células 3T3-*mdr1* con y sin VRP

El valor medio de los porcentajes de expulsión en el experimento medidos a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1* es significativamente diferente al de las células 3T3-*mdr1*+VRP ( $p=0.0005$ ). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 44.31 %, y el IC 95 % de la diferencia es de 40.40 a 48.23 %. Es decir, las células transfectadas, en presencia de VRP reducen su capacidad expulsora de DNR hasta aproximadamente la mitad que en las mismas células sin VRP.

**3.5.3.- Comparación entre las cinéticas de expulsión de las células 3T3 en ausencia de modulador y las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP.** Se han comparado a los 60 minutos los porcentajes de expulsión de DNR entre las células 3T3 sin VRP y las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP 10  $\mu$ M

Tipo celular	expulsión(medida a los 60 minutos)						
	n	porcentaje de expulsión (%)					
		media	DS	mediana	min	máx	IC 95 % media
3T3	14	32.0	4.98	30.3	24.2	41.6	29.39-34.60
MDR+VRP	14	33.8	6.2	34.3	18.0	41.9	30.51-37.08

Tabla 16: Resultados de la expulsión de DNR en las células 3T3 y 3T3-*mdr1* con VRP

El valor medio de los porcentajes de expulsión medidos a los 60 minutos en las células 3T3-*mdr1*+VRP no es significativamente diferente al de las células 3T3 sin modulador ( $p=0.4110$ ). La diferencia media de cantidad de fluorescencia es de 10.79 %, y el IC 95 % de la diferencia es de -2.61 a 6.19 %. Es decir que las células 3T3-*mdr1* en presencia de VRP tienen una capacidad expulsora de DNR similar a la de las células 3T3 sin modulador