

Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga

J.P. Burgués Gasión, J.L. Pontones Moreno*, C.D. Vera Donoso*, J.F. Jiménez Cruz*,
M. Ozonas Moragues

*Servicio de Urología. Hospital Universitario Son Dureta Palma de Mallorca. *Servicio de Urología. Hospital Universitario La Fe. Valencia.*

Actas Urol Esp 2005; 29 (9): 846-859

RESUMEN

MECANISMOS DEL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS IMPLICADOS EN LAS RESISTENCIAS A LOS FÁRMACOS DE USO INTRAVESICAL EN EL CÁNCER SUPERFICIAL DE VEJIGA

Numerosos estudios han demostrado la utilidad de la quimioterapia intravesical en la profilaxis de las recidivas del tumor vesical superficial después de la resección transuretral. Pero la eficacia de esta práctica puede verse limitada por la existencia de resistencias a agentes individuales o de multiresistencias a varios fármacos. Además de los mecanismos de resistencia clásicos o "unicelulares" determinados genéticamente, como la expresión de la glicoproteína P-170 (gen *mdr-1*), la sobreexpresión del gen *Bcl-2* o la actividad de la glutatión S-transferasa, existen otros mecanismos de resistencia "multicelular" que han podido ser demostrados en cultivos de agregados celulares tridimensionales, y no en las mismas células cultivadas en monocapa o en suspensión de células individuales. La adhesión célula-célula y célula-estroma condiciona por un lado una limitada penetración de las drogas y, por otro, unos gradientes de oxígeno y proliferación en los tejidos que crean distintas susceptibilidades al efecto citotóxico. El conocimiento de las resistencias y sus mecanismos es de gran importancia, puesto que se trata de uno de los puntos donde se puede actuar para optimizar la eficacia de la quimioterapia intravesical. Muchos investigadores han dedicado sus esfuerzos a la búsqueda de medios contra las resistencias mediante la aplicación de métodos para mejorar la penetración de los fármacos, la búsqueda de agentes reversores o la identificación de las resistencias con tests *in vitro* de quimiosensibilidad.

Palabras clave: Quimioterapia intravesical. Quimiorresistencia. Tumor vesical superficial.

ABSTRACT

CELL CYCLE AND APOPTOSIS MECHANISMS IMPLICATED IN INTRAVESICAL CHEMOTHERAPY RESISTANCES IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER

It is well documented the effectiveness of intravesical chemotherapy following transurethral resection to prevent recurrences of superficial bladder cancer. But it is also known that efficacy may be limited by tumour cell resistance to one or several of the drugs available for instillation. In addition to the genetically determined unicellular mechanisms classically described in the literature such as glycoprotein P-170 expression (*mdr-1*), overexpression of *Bcl-2* or glutathione S-transferase activity, it has been recently shown that multicellular mechanisms may also be involved in drug resistance. Multicellular resistance can only be demonstrated in three-dimensional cultures and fails to be shown in monolayers or cell suspensions. This is explained by the fact that cell-to-cell and cell-to-stroma adhesion limits drug penetration and by the variable susceptibility to cytotoxicity determined by oxygen and tissue proliferation gradients. A better understanding of the molecular mechanisms involved in drug resistance is necessary to increase intravesical chemotherapy effectiveness. Current research includes improving drug penetration, searching resistance reversing agents and developing *in vitro* chemosensitivity tests to identify drug resistance.

Keywords: Intravesical chemotherapy. Drug resistance. Superficial bladder neoplasms.

Numerosos estudios han mostrado la eficacia de la quimioterapia intravesical en la profilaxis de las recidivas de los tumores vesicales superficiales despu3s de la resecci3n transuretral (RTU)¹⁻⁴. En los tumores con alto riesgo de progresi3n como el T1G3 o el CIS se prefiere como tratamiento adyuvante de primera l3nea el uso de la inmunoterapia con bacilo de *Calmette-Gu3rin* (BCG), pero en el caso de tumores de riesgo bajo o intermedio como los Ta, los T1G1 y los T1G2 la Asociaci3n Europea de Urolog3a, en sus *Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer*⁵ aconsejan el uso de agentes quimioter3picos, dado que los efectos secundarios tanto locales como sist3micos son significativamente inferiores.

La reducci3n en las tasas de recurrencia a un a3o de los tumores vesicales superficiales con el uso de la quimioterapia intravesical alcanza el 44%, si lo comparamos con aquellos pacientes tratados s3lo con RTU⁶. Estudios m3s a largo plazo sugieren sin embargo, que cuando se sigue a los pacientes durante un periodo largo de tiempo las tasas de recidiva tienden a aumentar y las diferencias entre la RTU aislada y seguida de quimioprofilaxis se hacen mucho menores⁷. Aunque la eficacia a largo plazo queda pues cuestionada, se acepta una reducci3n de un 20-30% en la tasa global de recidiva, una disminuci3n al 50% en el n3mero de recidivas anuales, y un aumento significativo del intervalo libre de enfermedad hasta la aparici3n de la primera recidiva⁸. Adem3s de la terapia profil3ctica de las recidivas, la quimioterapia intravesical se ha mostrado tambi3n 3til como terapia ablativa de lesiones residuales o no asequibles a la cirug3a, de peque3as recidivas incipientes, o bien de tumores primarios en pacientes con contraindicaci3n absoluta a ser intervenidos⁹.

Existen varios agentes farmacol3gicos de uso com3n en nuestro medio para la prevenci3n de recidivas de tumor vesical superficial como la tiotepa (TIO), mitomicina C (MMC), adriamicina (ADR) y epirubicina (EPI). Todos han resultado ser eficaces en los distintos estudios cuando se han utilizado intravesicalmente en instilaciones repetidas^{1,3,4}. Seg3n un metaan3lisis de Kamat et al² hay un 44% de recurrencias con el uso de TIO intravesical, un 39% con ADR, un 36% con MMC

y un 39% con EPI. Por tanto, a pesar de la profilaxis con quimioterapia intravesical sigue existiendo un elevado 3ndice de recurrencias.

Se sabe que pueden existir resistencias que condicionen el fracaso de la quimioprofilaxis en los tumores vesicales superficiales. Estas resistencias pueden ser a f3rmacos individuales o a varios f3rmacos (multirresistencias), son variables de un tumor a otro y se desconocen cuando se trata al paciente. La elecci3n del agente en la pr3ctica cl3nica se realiza de modo emp3rico, s3lo en base a la experiencia o disponibilidad que se tiene con alguno de ellos.

Adem3s de los mecanismos de resistencia "cl3sicos" o "unicelulares" determinados gen3ticamente, como la expresi3n de la glicoprote3na P-170 (gen *mdr-1*) o de las prote3nas relacionadas con la multirresistencia (MRP), la sobreexpresi3n del gen *Bcl-2* o los niveles intracelulares de glutat3n (GSH) y la actividad de la glutat3n S-transferasa (GST), existen otros mecanismos de resistencia "multicelular" que han podido ser demostrados en cultivos de agregados celulares tridimensionales, y no en las mismas c3lulas cultivadas en monocapa o en una suspensi3n de c3lulas individuales. La adhesi3n c3lula-c3lula y c3lula-estroma condiciona por un lado una limitada penetraci3n de las drogas y, por otro, unos gradientes de ox3geno y proliferaci3n en los tejidos que crean distintas susceptibilidades al efecto citot3xico.

El conocimiento de las resistencias y sus mecanismos es de gran importancia, puesto que se trata de uno de los puntos donde se puede actuar para optimizar la eficacia de la quimioterapia intravesical. Muchos investigadores han dedicado sus esfuerzos a la b3squeda de medios contra las resistencias, unas veces con m3todos para mejorar la penetraci3n de las drogas en la pared vesical, otras con agentes que las reviertan y otras identific3ndolas mediante tests *in vitro* de quimiosensibilidad.

En la presente revisi3n, se comenzar3 con un breve resumen de los procesos biol3gicos que acontecen durante el ciclo celular y la apoptosis, cuyo conocimiento es esencial para entender los mecanismos de las resistencias. A continuaci3n se expondr3n los mecanismos unicelulares y multicelulares que se han identificado como cau-

santes de las resistencias en los tumores vesicales. Finalmente, se mostrarán algunos ejemplos que ilustran cómo el conocimiento de las resistencias puede tener su aplicación en la práctica clínica.

CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

Para entender las bases moleculares del cáncer, el mecanismo de acción de los agentes quimioterápicos y los mecanismos de la quimiorresistencia es necesario conocer los procesos biológicos que regulan el ciclo celular y la apoptosis.

En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis (Fig. 1), pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de *oncogenes* (codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de *genes supresores* (codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se decanta hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la línea celular. Pero un cáncer se define no sólo por la inmortalización de las células sino también por la capacidad invasora local y a distancia, para lo cual son necesarias mutaciones adicionales. Aquellas mutaciones que favorezcan la angiogénesis mediada por los factores de crecimiento

VEGF y *PD-EDGF* y la adhesión intercelular o a membranas basales mediada por las e-cadherinas, integrinas, cateninas, tailinas y otras moléculas de adhesión (genes *car* y *nm-23*) serán decisivas en la agresividad local y la capacidad metastásica del tumor.

CICLO CELULAR

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases (Fig. 1): en la fase G_0 o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G_1 (*gap* 1) de pre-síntesis, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G_2 (*gap* 2) o de postsíntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis. El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer "arrestadas" en G_0 durante años.

Las moléculas reguladoras del ciclo celular son universales y están muy conservadas durante la evolución. Distintas proteínas (Fig. 2) ejercen el control en la entrada y la progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo¹⁰⁻¹¹:

- *Proteín-quinasas dependientes de ciclinas* (*cyclin-dependent kinases* o *CDKs*): fosforilan elementos claves en la progresión del ciclo celular. Para ser activas requieren unirse a las ciclinas. Hay tres tipos: CDKs G_1 (CDKs 4, 6 y 2), CDKs fase S (CDK2) y CDKs mitóticas (CDKs 2 y 1).

- *Ciclinas*: proteínas que se unen a las CDKs y controlan su capacidad de fosforilación. Se denominan ciclinas porque se sintetizan y degradan durante el ciclo celular. Hay al menos 6 tipos de ciclinas distintas en mamíferos: A, B, C, D, E, F. También se clasifican en: ciclinas G_1 (D_1 , D_2 , D_3 y E), ciclinas fase S (A y E) y ciclinas mitóticas (A y B). Las ciclinas D_1 , D_2 y D_3 se sobreexpresan gracias a estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y se unen a las CDKs 4 y 6 que fosforilan parcialmente a la proteína del retinoblastoma (pRb) haciendo que la célula progrese en la fase G_1 temprana y no quede arrestada en G_0 .

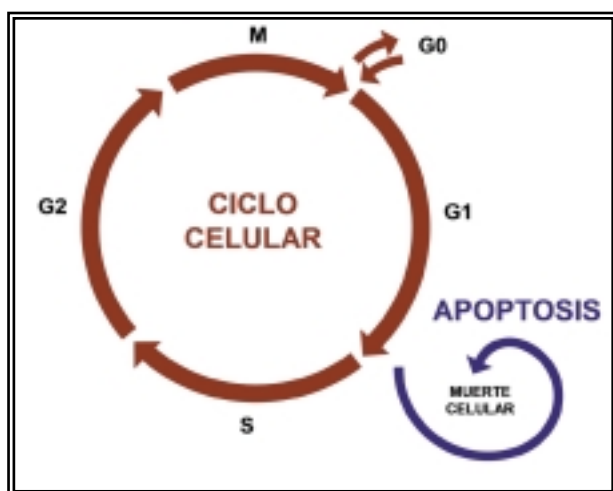


FIGURA 1: Ciclo celular y apoptosis. En el ciclo celular se distinguen varias fases: G_0 . Fase de reposo; G_1 . Fase de pre-síntesis; S. Fase de síntesis; G_2 . Fase de postsíntesis; M. Mitosis. En la apoptosis se produce la activación de las caspasas que inducen la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, la destrucción nuclear y citoplásmica y, por último, la fagocitosis por macrófagos.

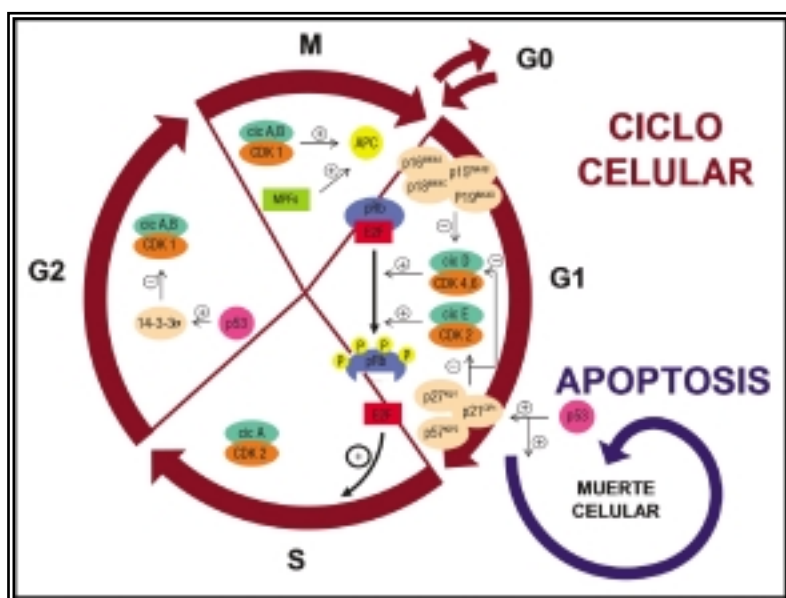


FIGURA 2: Mol6culas reguladoras del ciclo celular. Cic: ciclinas. pRb: prote3na del retinoblastoma. CDK: quinasas dependientes de ciclinas. E2F: factor de transcripci3n. MPF: factor de maduraci3n-promoci3n. APC: complejo promotor de la anafase.

Los complejos ciclina E - CDK2 se activan en la fase G₁ tard3a completando la fosforilaci3n de la pRb.

- **Inhibidores de las CDK (cyclin-dependent kinases inhibitors o CDKIs):** existen dos familias de CDKIs, la familia del inhibidor de la CDK4 (INK4) y la familia de la prote3na inhibidora de CDK (CIP / KIP). Las prote3nas de la familia INK4 (INK4A, INK4B, INK4C e INK4D) inhiben espec3ficamente a la CDK4 y la CDK6 en G₁, mientras que los inhibidores de la familia CIP / KIP (CIP1, KIP1 y KIP2) inhiben a las CDKs en todas las fases del ciclo. Las CDKIs mejor conocidas son la p16^{INK4A} (gen *mts-1*), la p15^{INK4B} (gen *mts-2*), la p18^{INK4C}, la p19^{INK4D}, la p21^{CIP1} (gen *waf-1*) y la p27^{KIP1} (gen *kip-1*).

- **Prote3na del retinoblastoma (pRb) y factor de transcripci3n E2F:** la pRb forma un complejo con miembros de la familia del factor de transcripci3n E2F. Cuando la pRb es fosforilada por las CDKs se libera el E2F, que induce el paso de G₁ a S al activar la maquinaria de s3ntesis del ADN. Recientemente se ha descrito el E2F6, una forma truncada e inactiva del E2F que se une a la pRb en las c3lulas en G₀.

- **Factor de maduraci3n-promoci3n (maturation-promoting factor o MPF):** protein-quinasa que en la meiosis induce la maduraci3n de los oocitos, y en

la mitosis interviene en la transici3n de G₂ a M. Una vez activado por las ciclinas, fosforila prote3nas implicadas en la rotura de la membrana nuclear, la condensaci3n de los cromosomas y la degradaci3n de las ciclinas.

- **Complejo promotor de la anafase (anaphase-promoting complex o APC):** recientemente descubierto, es capaz de iniciar la separaci3n de las crom3tidas hermanas en la anafase, favoreciendo la progresi3n de la fase M.

- **Ubiquitinas y proteosomas:** las ubiquitinas son peque3nas prote3nas que por acci3n de las enzimas activadora E1, conjugadora de ubiquitinas E2 y ubiquitin ligasa E3 se adhieren a un sustrato haci3ndolo susceptible de la proteolisis por un proteosoma. Los proteosomas son complejos proteicos

formados por m3ltiples subunidades responsables de la degradaci3n de las ciclinas y CKIs una vez han efectuado su acci3n fosforiladora en cada fase. Una vez degradadas se hace irreversible la marcha atr3s del ciclo.

- **Prote3na p53 (gen supresor TP53):** activa a la p21^{CIP1}, CDKI que inhibe la fosforilaci3n de la pRb impidiendo la liberaci3n del E2F, deteniendo el ciclo en G₁ e induciendo apoptosis. Tambi6n puede detener el ciclo en G₂ mediante la activaci3n de la prote3na 14-3-3σ, que secuestra el complejo ciclina B - CDK 1 fuera del n3cleo. Adem3s, la p53 activa genes reparadores del ADN (*mlh-1* y *mlh-2*) protegiendo de mutaciones y confiriendo estabilidad gen3tica. El gen *MDM-2* contrarregula a la p53 ubiquitin3ndola para hacerla susceptible a la degradaci3n proteos3mica.

- **Otras prote3nas:** factores de crecimiento (todos son promet3ticos excepto el TGF-β1), prote3nas promet3ticas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL), prote3nas proapopt3ticas de la familia Bcl-2 (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak).

Las c3lulas tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si alg3n error ocurre, bien para poder ser reparado, o bien para inducir la apoptosis cuando el da3o es muy extenso. En condiciones normales no se permite la progresi3n del ciclo hasta que el error no se

haya corregido; sin embargo, las c6lulas tumorales tienen mutada alguna de las prote6nas reguladoras y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente a6n sin integridad del ADN.

En cualquier tejido y tambi6n en los tumores existe un equilibrio entre las c6lulas que se encuentran en fase G_1 con las que est6n en reposo en G_0 . Las c6lulas en G_0 son relativamente inactivas con respecto a la s6ntesis de macrom6culas y, en consecuencia, insensibles a muchos de los antineopl6sicos, particularmente a los que afectan a esta s6ntesis. Los agentes quimioter6picos que act6an sobre las c6lulas en divisi6n m6s que sobre las c6lulas en G_0 se denominan "espec6ficos del ciclo celular", mientras que aquellos que act6an tambi6n sobre las c6lulas en G_0 reciben el nombre de "no espec6ficos del ciclo celular". A su vez, los espec6ficos del ciclo celular pueden ser "fase espec6ficos" si act6an s6lo sobre alguna de las fases, o "no fase espec6ficos"¹². Los agentes m6s frecuentemente utilizados en instilaci6n endovesical (tiotepa, adriamicina, epirubicina y mitomicina C) son todos m6s activos en las c6lulas en divisi6n, pero no se consideran espec6ficos del ciclo celular porque en alguna medida tambi6n act6an sobre las c6lulas en G_0 .

APOPTOSIS

La apoptosis es la forma fisiol6gica de suicidio celular que interviene en la embriog6nesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminaci6n de c6lulas infectadas, mutadas o da6adas. Morfol6gicamente, la diferencia con la necrosis es que en la apoptosis se produce la fragmentaci6n de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tard6os en la muerte celular. Bioqu6micamente, la caracter6stica diferencial es que se trata de un proceso dependiente de energ6a y de la s6ntesis de nuevas prote6nas, mientras que en la necrosis falla el aporte de energ6a y la s6ntesis de prote6nas se interrumpe¹³. En el proceso de apoptosis se distinguen varias fases: en la fase D_1 se producen los mecanismos moleculares que inician el fen6meno; en la fase F se fragmenta el ADN; en la fase D_2 se produce la destrucci6n nuclear y citopl6smica, y los restos son fagocitados por macr6fagos¹⁴.

Los procesos morfol6gicos y bioqu6micos que caracterizan a la apoptosis est6n mediados por

"efectores de muerte celular" como las caspasas (proteasas ciste6nicas). Pero para que estos efectores act6en es necesario que el balance vida-muerte se rompa por la interacci6n de los "activadores de muerte celular", extracelulares o intracelulares¹³:

- *Activadores de muerte extracelulares*: la supervivencia celular depende de la recepci6n de se6ales extracelulares adecuadas, en ausencia de las cuales la c6lula se suicida por el mecanismo de la apoptosis. Algunos ejemplos son:

- *Integrinas*: son mol6culas que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto celular. Pero adem6s de su funci6n estructural act6an como transductores de se6ales de supervivencia celular y de protecci6n frente a la apoptosis cuando el contacto con la matriz extracelular es adecuado.

- *Factores de crecimiento*: la supervivencia celular tambi6n depende de una exposici6n apropiada a factores de crecimiento.

- *Citocinas de muerte celular*: son capaces de iniciar directamente la muerte v6a apoptosis. Es el caso del ligando Fas y del factor de necrosis tumoral (*tumoral necrosis factor* o TNF), producidos por los linfocitos T y las c6lulas *natural killer*.

- *Activadores de muerte intracelulares*: un ejemplo es la familia de prote6nas Bcl-2, involucradas en el control de la apoptosis. Algunos miembros de la familia son anti-apopt6ticos (Bcl-2 y Bcl-xL) y otros son pro-apopt6ticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak).

Las se6ales apopt6ticas, tanto intra como extracelulares, convergen para activar a las caspasas. La condensaci6n de la cromatina, la fragmentaci6n del ADN, la rotura de la membrana nuclear y la formaci6n de cuerpos apopt6ticos son consecuencias directas de la actividad caspasa. Las caspasas en las c6lulas vivas existen como zim6genos inactivos que se activan por rotura proteol6tica mediante dos v6as alternativas que se ilustran en la Figura 3 y se describen a continuaci6n^{13,15}.

- *V6a del receptor de muerte celular*: los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia g6nica de receptores del TNF (TNFR). Los mejor caracterizados son el receptor Fas, tambi6n conocido como CD95 (*cytotoxicity-dependent protein 95*) o APO-1 (*apoptosis-1 protein*), y el receptor del

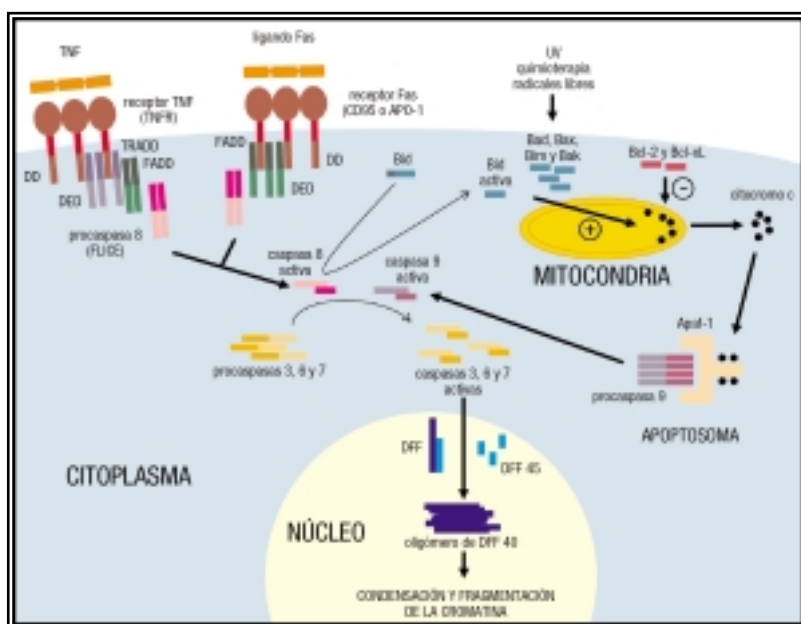


FIGURA 3: Vías apopt6ticas celulares: vía del receptor de muerte (TNF o ligando Fas/FADD/caspasa 8) y vía mitocondrial (familia Bcl-2/citocromo c/ Apaf-1/caspasa 9).

TNF (TNFR). Tienen en com6n una secuencia hom6loga denominada “dominio de muerte” (*death domain* o DD), capaz de iniciar la cascada de eventos que llevan a la apoptosis. Los ligandos para estos receptores pertenecen a la familia del TNF, y son el ligando Fas y el TNF. Estos ligandos, que normalmente existen en forma trim9rica, se unen a sus receptores induciendo tambi9n su trimerizaci6n y as9 activ6ndolos. El receptor Fas activado recluta mol9culas adaptadoras como el FADD / MORT-1 (*Fas-associated death domain / mediator of receptor-induced toxicity-1*), que contiene tambi9n un “dominio de muerte” (DD) que se une al an6logo del receptor Fas y un “dominio efector de muerte” (DED) que se une a un dominio an6logo de la procaspasa 8. Esta enzima, tambi9n conocida como FLICE (*FADD-like IL-1 β -converting enzyme*), sufre activaci6n autocatal9tica al unirse al FADD convirti9ndose en la caspasa 8 activa.

El complejo que forman el Fas, el FADD y la FLICE se denomina DISC (*death-inducing signaling complex*). La caspasa 8 rompe y activa otras caspasas efectoras como la 3, la 6 y la 7, que constituyen la principal actividad caspasa en las c9lulas apopt6ticas. En el caso de los receptores del TNF (TNFR-I y el TNFR-II), la mol9cula adap-

tadora que reclutan es el TRADD (*TNFR-associated death domain*), que a su vez sirve de plataforma para el reclutamiento de otros adaptadores como el FADD, el TRAF-2 (*TNFR-associated factor-2*) y el RIP (*receptor interactive protein*). El complejo formado finalmente activa las caspasas reguladoras y efectoras, al igual que lo hac9a el receptor Fas¹⁶.

- *Vía mitocondrial*: se trata de una v9a independiente de los receptores de muerte y es la que inducen los agentes quimioter6picos, la radiaci6n ultravioleta o las mol9culas de estr9s (especies reactivas del ox9geno y del n9tr6geno). Las mitocondrias son 6rganulos con dos compartimentos: la matriz, rodeada por la membrana interna (MI), y el espacio intermembranal, entre las membranas interna y externa (ME).

En la MI est9 la ATP sintetasa y la cadena respiratoria y en el espacio intermembrana est9 el citocromo c, que si se libera al exterior de la mitocondria induce la apoptosis. Las prote9nas de la familia Bcl-2 regulan esta liberaci6n: los miembros anti-apopt6ticos de esta familia (Bcl-2 y Bcl-xL) bloquean la liberaci6n del citocromo c, mientras que los miembros pro-apopt6ticos (Bax, Bim, Bid, Bad y Bak) la inducen. Cuando el citocromo c se libera se provoca el ensamblamiento del apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) con la procaspasa 9, form6ndose el complejo denominado apoptosoma. El apaf-1 tiene un dominio reclutador de caspasas denominado CARD (*caspase recruiting domain*), que requiere ATP para la inducci6n de la ruptura autol9tica de la procaspasa 9 en caspasa 9 activa. Esta 9ltima se libera del apoptosoma para activar a las caspasas 3, 6 y 7, que provocan la ruptura de diversos sustratos y la apoptosis.

Las se9ales de supervivencia extracelulares inhiben la apoptosis por activaci6n de una kinaasa que fosforila a la prote9na Bad haciendo que esta quede secuestrada en el citoplasma en lugar de ejercer su acci6n pro-apopt6tica en la mitocondria. Por el contrario, las se9ales apopt6ticas extracelulares traslocan a Bad y Bax al interior de la mitocondria, provocando as9 la liberaci6n del citocromo c en induciendo la activaci6n de las

caspasas. La prote6na Bid puede ser traslocada al interior de la mitocondria por la caspasa 8 (activada por el ligando Fas o el TNF), amplific6ndose as6 la apoptosis iniciada por la v6a del receptor de muerte.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Una vez vistos los procesos biol6gicos que regulan el ciclo celular y la apoptosis, se expondr6n los mecanismos unicelulares y multicelulares que se han descrito en la literatura como causantes de las resistencias a los f6rmacos de uso intravesical.

RESISTENCIA UNICELULAR

Los mecanismos de resistencia "unicelular" est6n determinados gen6ticamente. Las resistencias pueden ser inherentes a la propia estirpe tumoral, pero tambi6n pueden aparecer *de novo* durante la evoluci6n de la neoplasia por las mutaciones que se van produciendo en las c6lulas debido a su inestabilidad gen6tica. La aplicaci6n de drogas puede inducir una selecci6n natural por el sobrecrecimiento de aquellos clones resistentes.

Se sabe que pueden existir resistencias individuales a un solo agente o bien multiresistencias a varios f6rmacos. En el caso de los tumores vesicales se han podido demostrar distintos mecanismos de resistencia celular a los quimioter6picos, todos ellos relacionados con la expresi6n de alg6n gen. Estos genes codifican prote6nas que act6an unas veces como un canal que transporta al f6rmaco fuera de su lugar de acci6n (glicoprote6na-P y prote6nas relacionadas con la multiresistencia), otras inhibiendo la apoptosis (Bcl-2 y Bcl-xL), otras como una enzima detoxificadora (glutathion-S-transferasa), en otras ocasiones la prote6na se une al f6rmaco impidiendo su acci6n (metalotione6na), otras veces interviene en los procesos de replicaci6n y reparaci6n del ADN (topoisomerasa II- α), otras bloquea el receptor Fas impidiendo que los linfocitos T lleven a cabo la apoptosis receptor-inducida (prote6na FLICE inhibitoria), y otras veces se sabe s6lo su relaci6n con la quimiorresistencia pero no se conoce el mecanismo.

• *Sobreexpresi6n de la glicoprote6na P-170 (gen multidrug resistance-1 o mdr-1)*: Se trata de una

prote6na situada en la membrana nuclear y citopl6smica que act6a como un canal de flujo ATP-dependiente que bombea los f6rmacos al exterior. Cuando la aplicaci6n prolongada a un f6rmaco induce la sobreexpresi6n de la glicoprote6na-P, frecuentemente aparecen resistencias cruzadas con otros f6rmacos no relacionados, convirtiendo a la c6lula en multiresistente. En vejigas normales pedi6tricas y de adultos no se expresa, en los tumores transicionales no tratados lo hace d6bilmente, y en los tratados con quimioterapia intravesical o sist6mica la expresi6n est6 aumentada¹⁷. La exposici6n continuada a ADR en una l6nea celular sensible provoc6 su transformaci6n en otra resistente, con sobreexpresi6n de la glicoprote6na-P detectable por inmunohistoqu6mica, y ac6mulo del f6rmaco en las c6lulas demostrable con el microscopio de fluorescencia¹⁸. Estudios similares con MMC¹⁹ o con cisplatino²⁰ tambi6n han demostrado la aparici6n de resistencias mediadas por la sobreexpresi6n del *mdr-1*. Algunos estudios confieren valor pron6stico a la expresi6n de la glicoprote6na P-170²¹⁻²³, pero otros no han sido capaces de demostrarlo²⁴.

• *Sobreexpresi6n de las prote6nas relacionadas con la multiresistencia (multidrug resistance-associated proteins, MDR associated proteins o MRP)*: Son un grupo de prote6nas transportadoras ATP-dependientes que se sit6an en la membrana celular. Se han identificado 6 subfamilias dentro de las MRP humanas. En un estudio en una l6nea celular la sobreexpresi6n de las MRP fue inducida por el cisplatino a medida que las c6lulas iban adquiriendo resistencia²⁰. En otro estudio similar una l6nea celular de tumor vesical fue expuesta a dosis crecientes de ADR hasta que se hizo resistente. Se observ6 la sobreexpresi6n de las MRP como mecanismo de la resistencia²⁵. La expresi6n de MRP-1, MRP-2 y MRP-3 en tumores recurrentes y en tumores residuales tras tratamiento con ADR fue mucho mayor que en tumores primarios no tratados²⁶.

• *Sobreexpresi6n de la prote6na pulmonar relacionada con la resistencia (lung resistance-related protein, LRP)*: La LRP se sobreexpresa en 2/3 de los tumores vesicales primarios nunca tratados, y lo hace en mayor medida en bajos grados y estadios. Este hecho sugiere que la LRP puede constituir un mecanismo de multiresistencia

intrínseco del cáncer vesical en etapas tempranas²⁷. Los autores sugieren que antineoplásicos fuera del espectro de multirresistencia de la LRP podrían ser más efectivos en los tumores vesicales de bajo grado y estadio.

- **Sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL:** Estudios *in vitro* con líneas celulares han demostrado que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 y Bcl-xL confieren resistencia celular a los agentes quimioterápicos. La adición de un oligonucleótido antisentido que disminuye los niveles de la proteína Bcl-2²⁸ o de la Bcl-XL²⁹ revierten estas resistencias.

- **Sobreexpresión de la glutatión-S-transferasa (GST) y aumento del glutatión reducido (GSH):** La GST es una enzima celular que biotransforma la TIO conjugándola con GSH en monoglutationil-tiotepa o diglutationil-tiotepa, moléculas que son expulsadas al exterior de la célula mediante una bomba ATP-dependiente. Tanto la sobreexpresión de la GST como el aumento del GSH intracelular (sintetizado por la gamma-glutamyl-cistein sintetasa) confieren a las células tumorales una mayor capacidad de detoxificación y por tanto de resistencia a la tiotepa^{30,31} cisplatino²⁰ y otros citostáticos^{32,33}.

- **Sobreexpresión de la metalotioneína:** Es una proteína intracelular que se une a la MMC con gran afinidad impidiendo su acción sobre el ADN. Su cuantificación inmunohistoquímica tanto citoplásmica como nuclear en los tumores vesicales que recurrieron después de RTU seguida de tratamiento profiláctico con MMC fue significativamente mayor que en los que no recurrieron. La sobreexpresión de la metalotioneína predijo la resistencia del tumor a la terapia intravesical con MMC independientemente del grado tumoral³⁴.

- **Disminución de la expresión de la topoisomerasa II-β (gen TOP2A):** Esta enzima nuclear cataliza la ruptura y la nueva unión de la doble hélice del ADN imprescindibles para los procesos de transcripción, replicación y reparación del ADN. La sensibilidad de las células a las drogas que actúan inhibiendo la topoisomerasa II-α (antraclicinas) es mayor cuanto más cantidad de enzima exista en la célula. En líneas de tumor vesical resistentes a ADR se ha observado entre otros mecanismos de resistencia la disminución de los niveles de ARN mensajero (ARNm) correspondien-

te a la topoisomerasa II^{35,36}. En un estudio se tomaron muestras de los tumores antes de su tratamiento con EPI intravesical y, en los casos que recurrieron, después. Los niveles de ARNm de la topoisomerasa II en los tumores resistentes a la EPI (recurrentes) fueron significativamente menores que antes del tratamiento³⁷. Además de su relación con la quimiorresistencia se ha visto que los niveles intranucleares de topoisomerasa II-α detectados por inmunohistoquímica tienen un valor pronóstico independiente del grado y del estadio tumoral. Niveles altos indican una mayor probabilidad de recurrencia y una disminución de la supervivencia³⁸. En otro estudio la amplificación y sobreexpresión del gen TOP2A, además de asociarse a la amplificación del oncogen HER-2/NEU, se relacionó con una menor supervivencia en tumores vesicales infiltrantes³⁹.

- **Sobreexpresión de la prolina-dirigida proteína-quinasa F:** Se ha visto que su sobreexpresión detectada por inmunohistoquímica se relaciona con la quimiorresistencia, recurrencias y progresión de los tumores vesicales. La supresión de su sobreexpresión mediante un oligonucleótido antisentido consigue potenciar la quimiosensibilidad a varios agentes quimioterápicos²⁰.

- **Sobreexpresión de la proteína FLICE inhibidora (cFLIP):** Su sobreexpresión confiere resistencia a la apoptosis receptor-inducida en estudios *in vitro* en tumores vesicales⁴⁰.

- **Sobreexpresión del receptor del IGF-1:** Su bloqueo mediante un oligonucleótido antisentido consiguió en una línea celular sensibilizarla a la acción de la MMC, indicando que su sobreexpresión es un mecanismo de resistencia celular^{41,42}.

RESISTENCIA MULTICELULAR

Los mecanismos de resistencia "multicelular" aparecen en los cultivos de agregados celulares tridimensionales, y no en las mismas células cultivadas en monocapa o en una suspensión de células individuales⁴³⁻⁴⁵. Muy explícito al respecto es un estudio de Kugler et al⁴⁶ en el que 6 líneas celulares fueron cultivadas como monocapa y como esferoides celulares, y más tarde expuestas a varios agentes quimioterápicos durante 48 horas. Para todos los fármacos testados se observó una mayor resistencia en los esferoides en comparación con las monocapas. En el caso de los tumo-

res vesicales Erlichman et al⁴⁷ compararon la sensibilidad a la ADR en una línea de tumor vesical cultivada como monocapa, como esferoides y como xenoinjerto murino. Las células más superficiales de los esferoides mostraban la misma sensibilidad que las monocapas, pero las más internas eran más resistentes. Lo mismo se observó *in vivo* en los xenoinjertos.

Existen dos tipos de mecanismos implicados en la resistencia multicelular, los dependientes del contacto intercelular y los dependientes de la estructura tridimensional. Los primeros están mediados por las moléculas de adhesión y se presentan en cultivos en monocapa y en cultivos tridimensionales pero no en las suspensiones celulares, mientras que los segundos sólo se presentan en los cultivos tridimensionales.

MECANISMOS DEPENDIENTES DEL CONTACTO INTERCELULAR

- *Interacciones célula-célula mediante cadherinas y célula-estroma mediante integrinas:* Estas interacciones inducen la sobreexpresión del Bcl-2, proteína antiapoptótica. Ya se ha hablado del papel de las integrinas como transductores de señales de supervivencia, y de la pérdida de la adhesión como mecanismo extracelular activador de muerte. Se ha visto que cuando las células pierden estas interacciones se induce la apoptosis, fenómeno que describieron Frisch et al⁴⁸ y denominaron *anoikis* (en griego "sin casa"). En los tejidos normales el fenómeno *anoikis* protege de la diseminación de células sueltas y de su implantación en localizaciones anómalas. En los tumores sólidos y los esferoides tumorales la inhibición de la apoptosis en las células que están en contacto con su microentorno es uno de los mecanismos de la resistencia multicelular. Este fenómeno queda demostrado en estudios en los que la resistencia multicelular se revierte mediante proteasas que producen la disrupción de las uniones intercelulares. El mismo efecto reversor de la resistencia multicelular ejercen los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de adhesión⁴⁵.

- *Diferente expresión génica en los agregados celulares:* El contacto intercelular produce una modulación en la expresión de factores de crecimiento, receptores celulares, proteínas regulado-

ras del ciclo celular o enzimas nucleares implicadas en la replicación o reparación del ADN⁴⁵. Por ejemplo, la p27^{KIP1} es un inhibidor de las kinasas ciclín-dependientes que provoca la acumulación de células en las fases G₀ y G₁ del ciclo celular. Las células cuando confluyen sobreexpresan este inhibidor y se hacen más resistentes a muchos agentes quimioterápicos que encuentran menos células susceptibles de su acción. Otro ejemplo del que ya se ha hablado es la topoisomerasa II, que se expresa en niveles muy bajos cuando las células entran en contacto entre sí y su índice de proliferación es bajo, mientras que aumenta mucho en las células no confluyentes que crecen y se dividen rápidamente. Por este motivo los quimioterápicos inhibidores de la topoisomerasa II encuentran mayor resistencia en los cultivos tridimensionales o en las monocapas frente a los cultivos de suspensiones celulares.

MECANISMOS DEPENDIENTES DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

- *Permeabilidad de los agregados celulares a los fármacos:* Se sabe que la penetración de las drogas en el tejido tumoral puede ser limitada, tal como demuestra un estudio con una línea de tumor vesical cultivada en una matriz de colágeno en el que se vio el enlentecimiento en la penetración de varias drogas radiomarcadas⁴⁹. Dependiendo de lo lipofílicos que sean los fármacos o de su peso molecular la difusión en los esferoides puede variar⁵⁰. Esto sugiere que *in vivo* pueden quedar células alejadas de los vasos en las que no se alcance una concentración letal y que, por tanto, la penetración de los fármacos puede ser una causa importante de resistencia a la quimioterapia en tumores sólidos. La ADR se ha visto que en esferoides celulares penetra sólo en las capas más superficiales y necesita concentraciones muy elevadas para llegar al centro de los esferoides⁵¹.

- *Gradientes de oxígeno, nutrientes y proliferación:* Existen otros mecanismos dependientes del crecimiento tridimensional de las células en los esferoides que provocan gradientes de oxígeno, de nutrientes y de proliferación así como otras características similares a las de los tumores sólidos, que también son responsables de la mayor resistencia en cultivos tridimensionales. Se sabe

por ejemplo que la cantidad de c6lulas en diferentes fases del ciclo celular varía seg6n la profundidad del esferoide, siendo las m6s proliferativas y m6s sensibles las que se encuentran en la superficie, mientras que en las zonas internas est6n las c6lulas quiescentes (G_0) que son m6s resistentes⁵⁰. Cuando la quimioterapia produce la muerte de las c6lulas m6s externas, las c6lulas quiescentes m6s internas pasan a la superficie donde est6n mejor oxigenadas y regresan al ciclo celular reanudando la cin6tica de crecimiento celular del tumor. Este fen6meno, implicado en la resistencia multicelular, se conoce como *regrowth resistance* (resistencia por repoblaci6n) y fue descrito por Durand et al⁵². Se sabe tambi6n que la hipoxia que existe en el centro de los esferoides puede inducir la expresi6n de prote6nas relacionadas con la resistencia como la GST o la metalotione6na⁴⁵.

Existe una interrelaci6n entre la resistencia multicelular y la multiresistencia "cl6sica" mediada por la glicoprote6na P-170 (gen *mdr-1*). En c6lulas cultivadas como esferoides la resistencia mediada por el *mdr-1* es m6s marcada que en las mismas c6lulas cultivadas como monocapas y, a la inversa, la resistencia multicelular parece verse favorecida por la resistencia "cl6sica"⁵³.

Algunos autores⁵⁴⁻⁵⁶ encuentran *in vitro* altas resistencias a las antraciclinas EPI y ADR en comparaci6n con la MMC o la TIO. Probablemente se debe a que la EPI y la ADR se ven mucho m6s afectadas por la resistencia multicelular que la MMC o la TIO. Phillips et al⁵⁷ llegan a la conclusi6n de que la ADR y la EPI son menos activas en cultivos celulares en fase de *plateau* (como los cultivos tridimensionales) que en cultivos que se encuentran en fase de crecimiento exponencial (suspensiones), la TIO es igualmente citot6xica en ambas poblaciones celulares, y la MMC es m6s activa frente a las c6lulas en fase de *plateau*. Para explicar este hecho, hay que tener en cuenta que las antraciclinas ejercen su acci6n principalmente mediante la inhibici6n de la topoisomerasa II. Ya se ha dicho que esta enzima pasa a expresarse en niveles muy bajos cuando las c6lulas entran en contacto entre s6, se reduce el 6ndice proliferativo y queda una mayor fracci6n de c6lulas a fase de reposo (G_0),

mientras que aumenta mucho su expresi6n en cultivos no confluyentes que tienen menor proporci6n de c6lulas en reposo y mayor en divisi6n. La MMC o la TIO son por el contrario agentes alquilantes puros capaces de dañar el ADN en la misma medida en las c6lulas en G_0 y en las c6lulas en divisi6n.

Uno de los mecanismos por el que act6an los agentes intravesicales es el de la prevenci6n de la implantaci6n de c6lulas tumorales durante la RTU. En este caso la quimioterapia act6a sobre c6lulas sueltas y la resistencia multicelular revisita una menor importancia, siendo aqu6 igual de efectivos todos los agentes. Sin embargo, los f6rmacos intravesicales tambi6n pueden actuar sobre tumores microsc6picos coexistentes en el momento de la RTU o sobre tumores resecaos de forma incompleta. En estos casos ya no se trata de c6lulas sueltas sino de estructuras tridimensionales donde s6 puede tener importancia la resistencia multicelular y, por tanto, es posible que la MMC o la TIO sean m6s efectivas que la ADR o la EPI.

Pero trasladado a la cl6nica, ¿es realmente m6s efectiva la MMC?. Aunque cl6sicamente se ha dicho que ninguno de los agentes farmacol6gicos utilizados en instilaci6n endovesical es superior al resto, en muchos de los estudios los resultados son mejores para la MMC aunque sin alcanzarse la significaci6n estadística^{2,58-60}. Reciente, Huncharek et al⁶¹⁻⁶³ concluyen en sus metaan6lisis que probablemente la MMC es m6s activa que otras drogas utilizadas v6a intravesical y que la ADR es menos efectiva que el resto. En otro metaan6lisis en el que se compara MMC con BCG en tumores de riesgo intermedio y alto Shelley et al⁶⁴ no encuentran diferencias significativas en cuanto a la progresi6n y la supervivencia. Ning6n otro agente quimioter6pico intravesical ha logrado estos resultados.

APLICACI6N PR6CTICA

Veamos a continuaci6n algunos ejemplos de las implicaciones que para el tratamiento puede tener el conocimiento de las resistencias y sus mecanismos.

La utilizaci6n de f6rmacos que revierten las resistencias se denomina quimioterapia de modulaci6n. Consiste en la administraci6n de un

fármaco no citotóxico para permitir la acción del agente quimioterápico⁶⁵. En el caso de los tumores vesicales superficiales el agente más estudiado ha sido el verapamilo, un antagonista de los canales de calcio que inhibe la función de la glicoproteína P-170. Ya se ha hecho mención a la función de esta proteína como canal de membrana por el que se bombean al exterior las antraciclina y otros quimioterápicos, haciendo a las células resistentes a estos fármacos. Estudios *in vitro* con líneas celulares de tumor vesical, han puesto de manifiesto que en las células quimiosensibles la EPI se acumula sobre todo en el núcleo celular y algo en el citoplasma, mientras que en las resistentes los niveles globales de fluorescencia son menores, y el acúmulo se produce predominantemente en el citoplasma celular. El verapamilo aplicado a las células resistentes bloquea la glicoproteína P-170, consiguiendo que el patrón de distribución de la EPI sea similar al de las células sensibles^{66,67} y potenciando su acción citotóxica⁶⁸.

La glicoproteína P-170 también puede ser inhibida por las hormonas esteroideas⁶⁹, la estramustina⁷⁰ y algunos isoprenoides^{71,72}. Existe además una segunda generación de inhibidores de la glicoproteína P-170 como el biricodar (VX-710) o el valsopodar (PSC833) pero que han resultado bastante tóxicos^{73,74}. Otros moduladores de tercera generación con menor toxicidad como el tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933) y el ONT-093 (OC-144-093) se están ensayando actualmente en estudios fases I y II^{73,75}.

Otra línea de investigación abierta en los tumores vesicales multirresistentes es la de la sensibilización de las células tumorales a la apoptosis inducida por los linfocitos T y las células *natural killer*. En líneas celulares y en cultivos primarios de tumor vesical multirresistente se determinó la citotoxicidad inducida por el anticuerpo monoclonal anti-Fas, capaz al igual que el ligando Fas de activar la apoptosis por la vía del receptor de muerte. Se vio que sólo se inducía la apoptosis cuando se conseguía sobreexpresar el antígeno Fas (receptor Fas) en la superficie de las células mediante la administración conjunta de ADR. Esta sensibilización a la acción citotóxica de los linfocitos por la vía del receptor Fas se obtuvo con dosis pequeñas de ADR, sugiriendo la aplicación *in vivo*

de quimio e inmunoterapia combinada para el tratamiento de tumores vesicales resistentes⁷⁶. En otro estudio, los isotiocianatos también demostraron ser capaces de sensibilizar las células de tumor vesical a la apoptosis por la vía del receptor de muerte⁷⁷.

Para revertir la resistencia multicelular dependiente de la penetración de los fármacos en la mucosa vesical se han desarrollado diversas técnicas. La administración electromotriz multiplica entre 4 y 7 veces su transporte a través de las membranas biológicas en comparación con el transporte pasivo y consigue aumentar significativamente la eficacia de la quimioterapia intravesical^{78,79}. La hipertermia local aplicada mediante un dispositivo intrauretral emisor de microondas también mejora la penetración de las drogas y su eficacia clínica^{80,81}. En tumores de alto grado y CIS, la hipertermia ha mostrado eficacia no sólo en la profilaxis de recurrencias y la progresión sino también en la terapia ablativa⁸² y en el tratamiento de segunda línea tras fracasos de BCG⁸⁰.

Conocida la existencia de resistencias a agentes individuales o de multirresistencias, y sabiendo que estas son variables de unos tumores a otros aunque tengan la misma histología, algunos investigadores han desarrollado test de sensibilidad. Es lógico pensar que los resultados en términos de disminución de recurrencias o de retraso en su aparición pueden mejorar si la elección de la droga se hace en base a un test de quimiosensibilidad. En el caso de los tumores transicionales superficiales existen diversos tests en la literatura para las drogas utilizadas intravesicalmente^{54,83-86}. Su limitación más importante es que están basados en cultivos primarios en monocapa o en suspensión celular, por lo que sólo son capaces de reproducir *in vitro* los mecanismos de resistencia unicelulares. Nosotros estamos trabajando en un test de sensibilidad basado en cultivos tridimensionales, capaces de reproducir no sólo las resistencias unicelulares sino también las multicelulares⁸⁷.

REFERENCIAS

1. Debruyne FMJ, Witjes JA. Can intravesical chemotherapy prevent progression of superficial bladder cancer? In: Kurth KH, Mickisch GH, Schroder FH, editors. Renal, bladder and prostate cancer. An update. New York: The Parthenon Publishing Group 1999;223-226.
2. Kamat AM, Lamm DL. Intravesical therapy for bladder cancer. *Urology* 2000;55(2):161-168.

3. Kurth KH, Bouffloux C, Sylvester R, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Brausi M. Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group. *Eur Urol* 2000;37(3):1-9.
4. Witjes JA, Mungan NA, Debruyne FM. Management of superficial bladder cancer with intravesical chemotherapy: an update. *Urology* 2000;56(1):19-21.
5. Van der Meijden APM, Böhle A, Oosterlinck W, Lobel B, E. Rintala E, Solsona E, et al. Guidelines on non-muscle invasive bladder cancer: European Association of Urology; 2001.
6. Huncharek M, Geschwind JF, Witherspoon B, McGarry R, Adcock D. Intravesical chemotherapy prophylaxis in primary superficial bladder cancer: a meta-analysis of 3.703 patients from 11 randomized trials. *J Clin Epidemiol* 2000;53(7):676-680.
7. Lamm DL, Riggs DR, Traynelis CL, Nseyo UO. Apparent failure of current intravesical chemotherapy prophylaxis to influence the long-term course of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Journal of Urology* 1995; 153(5):1444-1450.
8. Kurth K, Tunn U, Ay R, Schroder FH, Pavone-Macaluso M, Debruyne F, et al. Adjuvant chemotherapy for superficial transitional cell bladder carcinoma: long-term results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized trial comparing doxorubicin, ethoglucid and transurethral resection alone. *J Urol* 1997;158(2): 378-384.
9. Martínez-Piñero L, Martínez-Piñero JA. Tratamiento del carcinoma vesical superficial. Quimioterapia local e inmunoterapia. Tratamiento del carcinoma in situ. In: Resel L, Moreno J, editors. *Tratado de oncología urológica*. Madrid: Sanidad y Ediciones, S.L.;2003;549-572.
10. Ivanchuk SM, Rutka JT. The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery* 2004;54(3):692-699; discussion 699-700.
11. DeWolf WC, Gaston SM. The cell cycle and its relevance to the urologist. *J Urol* 2004;171(4):1674-1681.
12. Skeel RT. Fundamentos biológicos y farmacológicos de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer. In: Skeel RT, editor. *Quimioterapia del cáncer*. 5ª ed. Madrid: Marbán Libros, S.L. 2000;3-19.
13. Gupta S. Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin Immunol* 2000;20(4):229-239.
14. Solé FJ, Chechile G, Algaba F, Villavicencio H, Cordon C. Regulación del ciclo celular. Bases moleculares de la carcinogénesis. In: *Biología molecular de los tumores urológicos*. Madrid: Ene Ediciones; 1995;61-66.
15. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* 2001a;69(25-26):2957-2964.
16. Gupta S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 2001b;1(3):317-324.
17. Benson MC, Giella J, Whang IS, Buttyan R, Hensle TW, Karp F, et al. Flow cytometric determination of the multidrug resistant phenotype in transitional cell cancer of the bladder: implications and applications. *Journal of Urology* 1991;146(4):982-986; discussion 986-987.
18. Guo H, Lu G, Xiong X, Dong J, Liu S. Establishment of doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line (BUI-87/ADMR) and its mechanism of multidrug resistance. *Chin Med J (Engl)* 1997;110(3):167-172.
19. Hayes MC, Birch BR, Cooper AJ, Primrose JN. Cellular resistance to mitomycin C is associated with overexpression of MDR-1 in a urothelial cancer cell line (MGH-U1). *Bju International* 2001;87(3):245-250.
20. Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH, Hsieh CY, et al. Characterization of chemoresistance mechanisms in a series of cisplatin-resistant transitional carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2000;20(5A):3221-3225.
21. Serretta V, Pavone C, Allegro R, Vella M, Sanguedolce R, Porcasi R, et al. Correlation between GP-170 expression, prognosis, and chemoresistance of superficial bladder carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129(8):472-476.
22. Tada Y, Wada M, Kuroiwa K, Kinugawa N, Harada T, Nagayama J, et al. MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. 2000;6(12):4618-4627.
23. Zhu YY, Kong CZ, Zeng Y, Pang GY, Yang CM, Sun ZX. [The role of cell adhesion, multidrug resistance and cell proliferation in short-term recurrent cases with T1G3 superficial bladder cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2003;41 (12):893-896.
24. Sanguedolce R, Calascibetta A, Porcasi R, Melloni D, Pavone C, Tomasino RM, et al. Does P-glycoprotein-170 expression predict for chemoresistance in transitional cell carcinoma of the bladder? *Anticancer Res* 2002;22(5): 2971-2976.
25. Naito S, Hasegawa S, Yokomizo A, Koga H, Kotoh S, Kuwano M, et al. Non-P-glycoprotein-mediated atypical multidrug resistance in a human bladder cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 1995;86(11):1112-1118.
26. Tada Y, Wada M, Migita T, Nagayama J, Hinoshita E, Mochida Y, et al. Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 2002;98(4):630-635.
27. Zhu Y, Kong C, Zeng Y, Sun Z, Gao H. Expression of lung resistance-related protein in transitional cell carcinoma of bladder. *Urology* 2004a;63(4):694-698.
28. Bilim V, Kasahara T, Noboru H, Takahashi K, Tomita Y. Caspase involved synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligonucleotides and adriamycin on transitional cell cancer cells. *Cancer Letters* 2000;155(2):191-198.
29. Lebedeva I, Raffo A, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA. Chemosensitization of bladder carcinoma cells by bcl-xL antisense oligonucleotides. *J Urol* 2001;166(2):461-469.
30. Cnubben NH, Rommens AJ, Oudshoorn MJ, Van Bladeren PJ. Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiotepa and transport of its metabolite monoglutathionylthiotepa in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Research* 1998;58(20):4616-4623.
31. Dirven HA, Dictus EL, Broeders NL, van Ommen B, van Bladeren PJ. The role of human glutathione S-transferase isoenzymes in the formation of glutathione conjugates of the alkylating cytostatic drug thiotepa. *Cancer Research* 1995;55(8):1701-1706.
32. Yang CR, Ou YC, Kuo JH, Kao YL, Chen CL, Yean SY, et al. Intracellular glutathione content of urothelial cancer in correlation to chemotherapy response. *Cancer Letters* 1997;119(2):157-162.
33. Yang W, Zeng X, Chen C, Chen Z, Du G. Correlative expression of glutathione S-transferase-pi and multidrug resistance associated protein in bladder transitional cell carcinoma. *J Tongji Med Univ* 2000;20(4):311-314.

34. Lynn NN, Howe MC, Hale RJ, Collins GN, O'Reilly PH. Over expression of metallothionein predicts resistance of transitional cell carcinoma of bladder to intravesical mitomycin therapy. *J Urol* 2003;169(2):721-723.
35. Hasegawa S, Abe T, Naito S, Kotoh S, Kumazawa J, Hipfner DR, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP), MDR1 and DNA topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cancer cell lines. *Br J Cancer* 1995;71(5):907-913.
36. Kim WJ, Kakehi Y, Yoshida O. Multifactorial involvement of multidrug resistance-associated [correction of resistance] protein, DNA topoisomerase II and glutathione/glutathione-S-transferase in nonP-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human bladder cancer cells. *Int J Urol* 1997;4(6):583-590.
37. Davies SL, Popert R, Coptcoat M, Hickson ID, Masters JR. Response to epirubicin in patients with superficial bladder cancer and expression of the topoisomerase II alpha and beta genes. *Int J Cancer* 1996a;65(1):63-66.
38. Koren R, Kugel V, Dekel Y, Weissman Y, Livne PM, Gal R. Human DNA topoisomerase-IIalpha expression as a prognostic factor for transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU Int* 2003;91(6):489-492.
39. Simon R, Atefy R, Wagner U, Forster T, Fijan A, Bruderer J, et al. HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 2003;107(5):764-772.
40. Jonsson G, Paulie S, Grandien A. High level of cFLIP correlates with resistance to death receptor-induced apoptosis in bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 2003;23(2B):1213-1218.
41. Sun HZ, Wu SF, Tu ZH. Blockage of IGF-1R signaling sensitizes urinary bladder cancer cells to mitomycin-mediated cytotoxicity. *Cell Res* 2001a;11(2):107-115.
42. Sun HZ, Wu SF, Tu ZH. Knockdown of IGF-1R by Antisense Oligodeoxynucleotide augments the sensitivity of bladder cancer cells to mitomycin. *Acta Pharmacol Sin* 2001b;22(9):841-846.
43. Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitain SJ, Teicher BA, Kerbel RS. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(8):3294-3298.
44. Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW, et al. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* 1990;247(4949 Pt 1):1457-1461.
45. Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36(2-3):193-207.
46. Kugler A, Haschemi R, Zoller G, Gross AJ, Kallerhoff M, Ringert RH. In vitro investigations of new therapeutic agents on bladder tumor cell lines. *Urol Res* 1997;25(4):247-250.
47. Erlichman C, Vidgen D. Cytotoxicity of adriamycin in MGH-U1 cells grown as monolayer cultures, spheroids, and xenografts in immune-deprived mice. *Cancer Res* 1984;44(11):5369-5375.
48. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124(4):619-626.
49. Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS, Egorin MJ. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association For Cancer Research* 2002;8(3):878-884.
50. Carlsson J, Nederman T. Tumor spheroids as a model in studies of drug effects. In: Bjerkvig R, editor. *Spheroid culture in cancer research*. Boca Raton: CRC Press;1992; 199-216.
51. Kerr DJ, Wheldon TE, Hydns S, Kaye SB. Cytotoxic drug penetration studies in multicellular tumour spheroids. *Xenobiotica* 1988;18(6):641-648.
52. Durand RE, Vanderbyl SL. Tumor resistance to therapy: a genetic or kinetic problem? *Cancer Commun* 1989;1(5):277-283.
53. Kolchinsky A, Roninson IB. Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. *Anticancer Res* 1997;17(5A):3321-3327.
54. Turkeri LN, Akdas G, Ozyurek M, Akdas A. The role of in vitro chemosensitivity tests to predict the clinical efficacy of antineoplastic agents in genito-urinary tumors. *Arch Esp Urol* 1998;51(4):398-404.
55. Uchibayashi T, Egawa M, Hisazumi H, Hasegawa T, Tanaka T, Sasaki T. In vitro chemosensitivity test for human genito-urinary tumors using collagen gel matrix. *European Urology* 1993;24(2):267-270.
56. Hirano Y, Kageyama S, Ushiyama T, Suzuki K, Fujita K. Clinical usefulness of chemotherapy based on an in vitro chemosensitivity test in urothelial cancer patients. *Anticancer Res* 2001;21(6A):4061-4066.
57. Phillips RM, Clayton MR. Plateau-phase cultures: an experimental model for identifying drugs which are bioactivated within the microenvironment of solid tumours. *Br J Cancer* 1997;75(2):196-201.
58. Huland H, Kloppel G, Feddersen I, Otto U, Brachmann W, Hubmann H, et al. Comparison of different schedules of cytostatic intravesical instillations in patients with superficial bladder carcinoma: final evaluation of a prospective multicenter study with 419 patients. *J Urol* 1990;144(1):68-71;discussion 71-72.
59. Paulson DF. Treatment of superficial carcinoma of the bladder. *World Journal of Urology* 1986;4:52-59.
60. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am* 1992;19(3):499-508.
61. Huncharek M, Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy versus BCG immunotherapy on recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder: metaanalytic reevaluation. *Am J Clin Oncol* 2003;26(4):402-407.
62. Huncharek M, Kupelnick B. The influence of intravesical therapy on progression of superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a metaanalytic comparison of chemotherapy versus bacilli Calmette-Guerin immunotherapy. *Am J Clin Oncol* 2004;27(5):522-528.
63. Huncharek M, McGarry R, Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res* 2001;21(1B):765-769.
64. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guerin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int* 2004;93(4):485-490.
65. Resel L, De la Pe6a E, Moreno J, Blanco E. Aspectos b6sicos de la quimioterapia en los tumores urol6gicos. In: Resel L, Moreno J, editors. *Tratado de oncolog6a urol6gica*. Madrid: Sanidad y Ediciones, S.L. 2003;163-178.

66. Davies CL, Duffy PM, MacRobert AJ, Loizidou MC, Cooper AJ, Taylor I. Localization of anthracycline accumulation in sensitive and resistant urothelial tumor cell lines. *Cancer Detect Prev* 1996b;20(6):625-633.
67. Duffy PM, Hayes MC, Gatrell SK, Cooper A, Smart CJ. Determination and reversal of resistance to epirubicin intravesical chemotherapy. A confocal imaging study. *British Journal of Urology* 1996a;77(6):824-829.
68. Harris NM, Duffy PM, Crook TJ, Anderson WR, Sharpe P, Hayes MC, et al. Intravesical pH: a potentially important variable affecting efficacy and the further development of anthracycline chemotherapy for superficial bladder cancer. *BJU Int* 2002a;90(9):957-964.
69. Lewin J, Cooper A, Birch B. Progesterone: a novel adjunct to intravesical chemotherapy. *BJU Int* 2002;90(7):736-741.
70. Jennings AM, Solomon LZ, Sharpe P, Hayes MC, Cooper AJ, Birch BR. Estramustine reversal of resistance to intravesical epirubicin chemotherapy. *European Urology* 1999;35(4):327-335.
71. Enokida H, Gotanda T, Oku S, Imazono Y, Kubo H, Hanada T, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated paclitaxel resistance by new synthetic isoprenoids in human bladder cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 2002;93(9):1037-1046.
72. Nakagawa M, Enokida H, Gotanda T, Tachiwada T, Imazono Y, Kubo H, et al. Taxol resistance and its reversal by synthetic isoprenoids in human bladder cancer cell line. *Aktuelle Urol* 2003;34(4):250-252.
73. Ross DD. Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17(4):641-651.
74. Greenberg PL, Lee SJ, Advani R, Tallman MS, Sikic BI, Letendre L, et al. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine with or without valspodar in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III trial (E2995). *J Clin Oncol* 2004;22(6):1078-1086.
75. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003;10(2):159-165.
76. Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O, Fukumoto M, Bonavida B. Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to Fas-mediated cytotoxicity. *Cancer* 1997;79(6):1180-1189.
77. Pullar JM, Thomson SJ, King MJ, Turnbull CI, Midwinter RG, Hampton MB. The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Carcinogenesis* 2004;25(5):765-772.
78. Colombo R, Brausi M, Da Pozzo L, Salonia A, Montorsi F, Scattoni V, et al. Thermo-chemotherapy and electromotive drug administration of mitomycin C in superficial bladder cancer eradication. a pilot study on marker lesion. *European Urology* 2001;39(1):95-100.
79. Di Stasi SM, Giannantoni A, Stephen RL, Capelli G, Navarra P, Massoud R, et al. Intravesical electromotive mitomycin C versus passive transport mitomycin C for high risk superficial bladder cancer: a prospective randomized study. *J Urol* 2003;170(3):777-782.
80. Van der Heijden AG, Kiemeny LA, Gofrit ON, Nativ O, Sidi A, Leib Z, et al. Preliminary European results of local microwave hyperthermia and chemotherapy treatment in intermediate or high risk superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2004;46(1):65-71; discussion 71-72.
81. Colombo R, Da Pozzo LF, Salonia A, Rigatti P, Leib Z, Baniel J, et al. Multicentric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4270-4276.
82. Gofrit ON, Shapiro A, Pode D, Sidi A, Nativ O, Leib Z, et al. Combined local bladder hyperthermia and intravesical chemotherapy for the treatment of high-grade superficial bladder cancer. *Urology* 2004;63(3):466-471.
83. Weaver DJ, Barrett BA, Ross G, Adelstein EH. Transitional explant reduction assay-a new in vitro testing system for intravesical chemotherapy. *The Journal of Urology* 1986;135(2):386-391.
84. Irisawa C, Aikawa K, Ogihara M, Hashimoto T, Yamaguchi O, Shiraiwa Y, et al. [Clinical results of prophylactic intravesical chemotherapy on superficial bladder cancer using the dye exclusion assay]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1992;83(11):1828-1834.
85. Gontero P, Sargent JM, Hopster DJ, Lewandowicz GM, Taylor CG, Elgie AW, et al. Ex vivo chemosensitivity to mitomycin C in bladder cancer and its relationship with P-glycoprotein and apoptotic factors. *Anticancer Res* 2002;22(6C):4073-4080.
86. Anton-Aparicio LM, Urmeneta J, Borrás M, Balaguer R, Berian JM. In vitro clonal assay as a predictive test of sensitivity to cytostatics in carcinoma of the human bladder. *Actas Urol Esp* 1985;9(6):517-522.
87. Burgués JP, Gómez L, Pontones JL, Vera Donoso CD, Jiménez-Cruz JF, Ozonas M. A chemosensitivity test for superficial bladder cancer based on three-dimensional culture of tumour spheroids. In: XXth EAU Congress. Abstract number 880. Istanbul 2005.

Dr. J.P. Burgués Gasi6n
 Servicio de Urología. Hospital Univ. Son Dureta
 Andrea Doria, 55
 07014 Palma de Mallorca (Balears)
 e-mail: jpburgues@pulso.com

(Trabajo recibido el 25 de abril de 2005)