

Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais

Cyclosporin A and analogues as multidrug resistance modulating agents in tumour cell

Karen Wagner-Souza,¹ Michelle Castro Meletti-de-Oliveira,² Raquel C Maia³ e Vivian M Rumjanek⁴

Resumo

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um dos principais obstáculos no tratamento quimioterápico de pacientes com câncer. O processo de resistência é multifatorial, mas o mecanismo mais bem caracterizado é a superexpressão da glicoproteína P (Pgp), uma proteína de membrana plasmática que funciona como uma bomba de efluxo levando a uma diminuição da concentração intracelular do quimioterápico. A circunvenção da resistência pode ser obtida utilizando-se agentes reversores capazes de inibir a atividade funcional da Pgp e de outras bombas de efluxo relacionadas. Nesta revisão, discutimos o uso do imunossupressor Ciclosporina A (CSA) e de seus análogos como agentes reversores da MDR. Aspectos como sua combinação com ciclofilinas, sua capacidade de inibir a atividade funcional da Pgp e seu uso clínico, especialmente em leucemias, são discutidos baseados tanto na literatura quanto em resultados dos próprios autores.

Palavras-chave: resistência a múltiplas drogas; leucemia; quimioterapia; ciclosporina A; glicoproteína P; barreira hemato-encefálica; agentes reversores; análogos de ciclosporina A.

Abstract

Multidrug resistance (MDR) to chemotherapy is one of the major obstacles in the treatment of cancer patients. The resistance process is multifactorial but the best characterized mechanism involved is the overexpression of P-glycoprotein (Pgp), a plasma membrane protein that functions as an efflux pump leading to a decreased intracellular drug concentration. Circumvention of MDR can be obtained using reversing agents capable of inhibiting the activity of Pgp and other drug efflux pumps. In the present review the use of the immunosuppressive agent Cyclosporin A and its analogues as reversing agents is discussed. Aspects such as their combination to cyclophilins, their ability to modify Pgp functional activity and their clinical use, especially in leukemias, are discussed based on the literature and on the authors results.

Key words: multiple drug resistance; leukemia; chemotherapy; A-cyclosporine; P-glycoprotein; blood-brain barrier; reversing agents; A-cyclosporine analogues.

¹Doutora. Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ - Brasil.

²Bióloga. Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ - Brasil.

³Doutora em Biologia Celular e Molecular. Médica Hematologista, Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer, RJ - Brasil.

⁴PhD. Professora Titular, Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ - Brasil. *Enviar correspondência para V.M.R.* Laboratório de Imunologia Tumoral, Depto de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Cidade Universitária; 21941-590 Rio de Janeiro, RJ - Brasil. *E-mail:* vivian@bioqmed.ufrj.br

O FENÔMENO MDR

A resistência a múltiplas drogas (MDR) representa um dos grandes problemas na terapia do câncer. O termo MDR é usado para descrever um fenômeno caracterizado pela capacidade de células tumorais apresentarem uma resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados.

Dentre os vários mecanismos MDR identificados, o mais bem caracterizado envolve a expressão do produto do gene MDR-1 de 170 KDa, conhecido como a glicoproteína P (Pgp).^{1,2} A Pgp foi primeiro identificada por Juliano e Ling³ em células tumorais MDR, e mais tarde estudos de transfecção demonstraram que a expressão aumentada da Pgp é suficiente para conferir o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.⁴ Esta proteína funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, capaz de transportar drogas para o exterior da célula, diminuindo a concentração intracelular a níveis subletais.^{1,2,5} A Pgp pertence à superfamília ABC (ATP Binding Cassette) de transportadores ativos, também chamados de ATPases de transporte.^{2,6} Além da Pgp, a expressão de outras proteínas também foi relacionada ao fenômeno MDR, entre elas a MRP (proteína associada a MDR) identificada por Cole et al,⁷ que também faz parte da superfamília ABC e que, à semelhança da Pgp, é capaz de extrair várias substâncias, mas preferencialmente conjugadas a glutatona;^{8,9} a LRP (proteína relacionada à resistência no pulmão), descrita por Scheper et al,¹⁰ sendo implicada no transporte bidirecional de substâncias entre o núcleo e o citoplasma;¹¹ e a BCRP (proteína de resistência ao câncer de mama), também conhecida como BCRP / MXR / ABCP, recentemente identificada em linhagens celulares (câncer de mama e cólon) resistentes à mitoxantrona, que exibem resistência a múltiplas drogas sem expressão de Pgp ou MRP.¹²⁻¹⁴ BCRP faz parte da família ABC dos hemitransportadores, requerendo a formação de dímeros para a produção de uma proteína funcional.

REVERSÃO DA MDR

O fenômeno MDR pode ser revertido com o uso de substâncias capazes de inibir o efluxo de drogas, dessa forma aumentando sua concentração intracelular e conseqüentemente o efeito citotóxico. Dentre elas podemos citar o grupo dos bloqueadores de canais de cálcio, como Verapamil (VP);¹⁵⁻¹⁷ Trifluoperazina (TFP), uma fenotiazina com ação antidepressora e conhecida antagonista de calmodulina;^{16,18} a substância imunossupressora Ciclosporina A (CSA).^{17,19-21}

Tanto VP quanto CSA e TFP são conhecidos como reversores de primeira geração. Embora o mecanismo de reversão da MDR pelas substâncias moduladoras não seja ainda completamente conhecido, sugere-se a possibilidade de interferência direta com a ligação da droga à Pgp ou MRP (inibição competitiva), alteração na fluidez e permeabilidade da membrana, resultando numa maior acumulação das drogas, mudanças conformacionais nas proteínas de transporte pelos moduladores, e a inibição de proteína cinase C (PKC), visto que a ativação de PKC leva à ativação da Pgp.

Um fator limitante do uso de reversores da MDR são as altas doses necessárias para potencializar os efeitos dos quimioterápicos, resultando numa toxicidade muitas vezes inaceitável ao organismo. Neste sentido, agentes reversores menos tóxicos e mais potentes têm sido desenvolvidos, sendo conhecidos como moduladores de segunda e terceira gerações. Como exemplos podemos citar a substância PSC-833 ou CSD, um análogo de CSA não imunossupressivo e menos nefrotóxico;^{22,23} um análogo de VP sem atividade bloqueadora de canal de cálcio;^{24,25} o derivado carboxamida acridona, GF120918, um modulador multiespecífico da MDR^{26,27} capaz, inclusive, de reverter completamente a resistência mediada por BCRP;²⁸ o difluorociclopropil dibenzosuberano, LY335979, um dos mais potentes inibidores seletivos da Pgp;²⁹ o derivado amido-keto-pípecolinato, VX-710, um potente inibidor da Pgp e capaz de inibir também o transporte mediado pela MRP.^{17,30}

Uma grande atenção foi dada à CSA como agente reversor, por ser uma substância já bem conhecida na clínica como imunossupressora e por ser capaz de reverter tanto Pgp quanto MRP e BCRP, como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1. Moduladores da MDR.

Agente Modulador	Proteína Modulada
Verapamil ¹⁵⁻¹⁷	Pgp, MRP
Ciclosporina A ^{17,19,20,21}	Pgp, MRP, BCRP
Trifluoperazina ^{16,18}	Pgp
Quinina ³¹	Pgp
Tamoxifen ³²	Pgp
Dexverapamil ³³	Pgp
PSC-833 ^{22,23}	Pgp
Genisteína ³⁴	MRP
GF120918 ^{26,27}	Pgp, BCRP
LY335979 ²⁹	Pgp
VX-710 ^{17,30}	Pgp, MRP
Probenacida ³⁵	MRP
Butionina sulfoximina ^{2,23}	MRP
PAK-104P ^{36,37,38}	LRP, MRP

Pgp - glicoproteína P; MRP - proteína associada a MDR; LRP - proteína relacionada à resistência no pulmão; BCRP - proteína de resistência ao câncer de mama.

CSA, SEUS ANÁLOGOS E SUAS AFINIDADES POR CICLOFILINAS

A CSA é um undecapeptídeo cíclico, neutro e lipofílico extraído do fungo *Tolyocladium inflatum* Gans, que se apresenta com atividade imunossupressora para as células T e capaz de se ligar à calmodulina, inibindo a ativação de proteína cinase dependente da calmodulina.³⁹ Além disso, a CSA pode se ligar à proteína ciclofilina. O complexo CSA-ciclofilina liga-se à calcineurina, uma fosfatase serina treonina dependente de cálcio e calmodulina, inibindo sua capacidade de defosforilar fatores nucleares presentes no citosol, impedindo desta forma, que eles sejam translocados para o núcleo e ativem a transcrição de várias citocinas, principalmente a IL-2, necessárias à ativação linfocitária.^{40,41}

O receptor intracelular de CSA consiste de uma família de proteínas altamente conservadas durante a evolução, as ciclofilinas ou imunofilinas, encontradas em bactérias, fungos, plantas e vertebrados, sendo peptidil-prolil cis-trans-isomerases envolvidas no enovelamento, transporte e montagem de proteínas, bem como na transdução de sinal e regulação do ciclo celular.⁴² Várias isoformas de ciclofilinas têm sido identificadas, sendo a Ciclofilina A a isoforma citosólica mais abundante. Pelo menos oito tipos diferentes de ciclofilinas são encontradas no homem, e eles diferem na sua localização subcelular (como as ciclofilinas B e C presentes no retículo endoplasmático e a ciclofilina D na mitocôndria) e na afinidade por CSA.⁴² As ciclofilinas têm sido identificadas em células neuronais do cérebro,⁴³ na membrana plasmática de linfócitos,⁴⁴ no núcleo,⁴⁵ no retículo endoplasmático,⁴⁶ na matriz mitocondrial.⁴⁷ Por sua ampla distribuição em diferentes locais e tipos celulares, sugere-se que tenha importantes papéis fisiológicos, além de sua capacidade de ligação a CSA no processo de imunossupressão. Por exemplo, no cérebro, sugere-se que esteja envolvida no enovelamento e maturação de proteínas neuronais;⁴⁸ no retículo endoplasmático, parece estar associada a canais de liberação de cálcio mediados por IP₃;⁴⁶ na mitocôndria, parece associada à abertura do poro transitório de permeabilidade.⁴⁷ Pelo menos neste último sistema, a CSA é capaz de modular a abertura do poro via interação com ciclofilina. De maneira análoga, a formação do complexo CSA-ciclofilina é necessária para a imunossupressão.^{41,42} Em um outro sistema, Damaso e Moussatché⁴⁹ sugeriram que a inibição da replicação do vírus vaccinia por CSA e seus análogos esteja correlacionada com sua afinidade por ciclofilinas celulares. Ainda não se sabe se a atividade reversora da MDR por CSA é dependente de sua ligação a ciclofilinas. Os imunossupressores FK506 e Rapamicina, que

também se ligam às imunofilinas, possuem atividade reversora da MDR.⁵⁰ No entanto, a substância PSC-833, um análogo de CSA não imunossupressivo, também se mostrou um potente reversor da MDR,^{22,23} como dito anteriormente.

MODELO MDR EXPERIMENTAL

No sentido de se obter uma aproximação experimental no estudo de células resistentes, um modelo MDR foi estabelecido em nosso laboratório,^{51,52} baseado na técnica descrita por Tsuruo et al,⁵³ a partir de uma linhagem de eritroleucemia humana, K562 (não MDR). As células foram selecionadas durante 22 semanas a doses crescentes do quimioterápico Vincristina (VCR), até que fossem capazes de crescer tão bem em meio de cultura quanto em meio contendo VCR, e foram chamadas K562-Lucena I ou apenas Lucena I.

A atividade reversora de uma substância pode ser estudada utilizando-se células resistentes selecionadas e o corante fluorescente rodamina 123, que é capaz de mimetizar o quimioterápico entrando passivamente na célula e sendo expulso por moléculas transportadoras MDR. O acúmulo celular de rodamina pode ser medido por citometria de fluxo, sendo um método rápido e eficiente de medir a atividade funcional da Pgp.^{54,55} Resultados do nosso grupo mostraram que as células K562 são capazes de acumular o corante, ao contrário das células Lucena I, demonstrando sua capacidade em extruí-lo.^{52,56-58} Observamos também que a CSA foi capaz de modular eficientemente a atividade da Pgp nas células Lucena I.^{52,57-59} Outros autores verificaram que análogos da CSA possuem capacidade diferenciada de inibir a atividade de extrusão da Pgp por células resistentes.⁶⁰

Uma outra forma de se estudar a modulação da resistência envolve a cultura celular em presença das substâncias moduladoras a serem testadas para observação dos efeitos do quimioterápico na sobrevivência das células. A medida das células remanescentes viáveis pode ser feita utilizando o método MTT (Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol), que mede a atividade desidrogenase mitocondrial, sendo um método colorimétrico baseado na habilidade de células vivas reduzirem o sal tetrazolium a um produto formazan.⁶¹ Os nossos resultados mostraram a sensibilidade das células K562 ao quimioterápico VCR, ao contrário das células Lucena I.⁵⁶⁻⁵⁸ Além disso, em células Lucena I, a CSA e seu análogo CSD combinados a VCR foram capazes de eficientemente reverter sua resistência. Por outro lado, a utilização de CSH, um outro análogo de CSA, combinado a VCR, não foi capaz de reverter a resistência dessas células.⁵² Diferenças na atividade reversora da MDR por análogos de CSA também foram descritas

por outros autores utilizando outras linhagens MDR,⁶²⁻⁶⁴ encontrando resultados semelhantes.

CSA, MDR E A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A expressão da Pgp não é restrita às células tumorais. Ela é normalmente expressa no intestino, adrenais, rim, fígado,^{65,66} sendo provável que desempenhe um papel na fisiologia normal do organismo e no processo de detoxificação de substâncias xenobióticas do corpo. Além disso, a Pgp é também expressa nas células endoteliais das barreiras hematoencefálica e testicular.⁶⁷ Evidências experimentais do papel da Pgp na barreira hematoencefálica vêm dos estudos com camundongos *knock-out* (ausentes) para o gene *mdr 1* (que codifica a Pgp), que apresentam um aumento da sensibilidade ao pesticida Ivermectina no sistema nervoso central (SNC) e um decréscimo na eliminação da droga.⁶⁸ Estudos de biodistribuição no cérebro mostram que camundongos sem Pgp apresentam os níveis de várias drogas aumentados, como por exemplo CSA, quando comparados com camundongos Pgp positivos.⁶⁹ Além disso, o bloqueio da Pgp da barreira hematoencefálica por PSC-833 foi capaz de aumentar os níveis cerebrais de ivermectina⁷⁰ e digoxina.⁷¹ Resultados semelhantes foram observados quando utilizamos CSA e TFP, que também foram capazes de aumentar a neurotoxicidade de ivermectina em camundongos e mostrar o acúmulo de ivermectina no cérebro.⁷² A dose de CSA utilizada (50mg/kg) foi dada intraperitonealmente, sendo efetiva em aumentar a toxicidade aguda de ivermectina, ao contrário dos resultados de Didier e Loor,⁷⁰ onde esta mesma dose de CSA sendo dada oralmente não foi capaz de aumentar a toxicidade de ivermectina. Um outro trabalho utilizando Verapamil, CSA e GF120918 resultou em um acúmulo aumentado de morfina e rodamina 123 no cérebro bovino.⁷³ Neste sentido, o uso de agentes moduladores da resistência, como por exemplo, CSA e seus análogos, pode ter implicações na expressão fisiológica da Pgp, na absorção e penetração de drogas em santuários protegidos por estas barreiras, podendo se tornar potencialmente uma estratégia importante no tratamento de tumores cerebrais.

USO CLÍNICO DE CSA E ANÁLOGOS EM TUMORES

A possibilidade de reverter clinicamente a resistência múltipla a quimioterápicos foi inicialmente estudada por Ozols et al,⁷⁴ utilizando verapamil intravenoso no

tratamento de câncer de ovário. Este estudo foi seguido por vários outros, também utilizando verapamil, em diferentes tipos de câncer.^{75,76} No entanto, a cardiotoxicidade observada foi bastante elevada, desencorajando o uso desta substância como agente reversor na clínica. Naquela época, vários estudos buscaram então novos reversores e analisaram a sua aplicabilidade clínica como parte de uma abordagem terapêutica em tumores humanos refratários a tratamento (revisto em⁷⁷). Ensaaios clínicos empregando a modulação da MDR são complicados tanto pelas interações farmacocinéticas decorrentes da inibição da Pgp em tecidos normais, aumentando desta forma a toxicidade dos quimioterápicos associados, quanto pelos efeitos farmacológicos isolados do próprio agente modulador que muitas vezes produz toxicidade severa em doses necessárias para efetivamente bloquear a atividade Pgp tumoral.⁷⁸⁻⁸¹

Uma série de trabalhos sobre a aplicabilidade clínica da modulação da MDR, fase I/II e mais recentemente trabalhos fase III, vem sendo conduzida nos últimos 10 anos. Esses estudos são realizados na maioria das vezes em leucemias refratárias, sendo raras as pesquisas dirigidas aos pacientes com tumores sólidos.⁸²⁻⁸⁸ Os primeiros estudos, fase I/II, realizados no início dos anos 90 (Tabela 2) englobavam um pequeno número de pacientes e quase sempre incluíam aqueles em fase avançada da doença. Nessa época, os pacientes não eram adequadamente selecionados, visto que todos já se encontravam em estágios avançados da doença. Além da resposta, a toxicidade ao novo protocolo se constituía num ponto importante da investigação clínica.

Também na nossa experiência,⁸⁵ os pacientes haviam sido intensamente tratados antes da modulação clínica e o estudo incluiu aqueles que se encontravam em segunda e terceira recaída da doença. A heterogeneidade do *performance status* dos pacientes e dos tipos de leucemias, assim como a utilização de apenas um quimioterápico no protocolo, pode ter sido a razão para o baixo número de resposta ao tratamento. Por outro lado, a toxicidade foi aceitável possivelmente devido ao emprego de somente uma droga associada a CSA. Um estudo recente⁹² reduziu a taxa de mortalidade e aumentou o percentual de resposta, devido possivelmente ao emprego de quimioterapia em altas doses associada à CSA e à utilização do fator de crescimento hematopoético G-CSF.

Nos dias atuais, os trabalhos clínicos randomizados conduzidos por grupos cooperativos se constituem num modelo adequado, pois englobam um número substancial de pacientes com o mesmo tipo de leucemia.

Tabela 2. Trabalhos clínicos sobre modulação da MDR em leucemias.

Autores	Tipo de Estudo	Pacientes n°	Tipo de Leucemia (status)	Tratamento	Resposta (n° ou %)
Solary et al, 1992	Fase I/II	15	LLA, LMA, SMD, LMC-FB (refratárias)	MIT+ARAC-HD+QUININO	RC (8)
Marie et al, 1993	Fase I/II	16	LLA, LMA, LMC-FB, SMD (refratárias)	MIT + ETO + CSA	RC (2)
Maia et al, 1997	Fase I/II	15	LLA, LMA, LMC-FB (refratárias)	ETO+CSA	RC (2)
List et al, 2001	Fase III (2 braços)	226	LMA (refratárias)	Braço A: DNR+ARA-C+CSA Braço B: DNR+ARA-C	Braço A: RC (39%), Braço B: RC: (33%)
List et al, 2002	Fase III (2 braços)	73	LMC (Fase blástica)	Braço A: ARA-C-HD+ DNR+CSA Braço B: ARA-C-HD + DNR	Braço A: RC/RFC (8%) Braço B: (30%)
Bassan et al, 2002	Fase I	18	LMA, LLA (refratárias)	ARA-CHD+IDA+CSA+G-CSF	RC (11)
Baer et al, 2002	Fase III (2 braços)	120	LMA (<i>de novo</i>)	Braço A: ARA-C + DNR+ETO+PSC Braço B: ARA-C+DNR+ETO	Braço A: RC (39%) Braço B: (46%)

ARA-CHD: Ara-C em altas doses; ETO: etoposido; DNR: daunorrubicina; PSC: PSC-833; MIT: mitoxantrone; CSA: ciclosporina; RC: remissão completa; RFC: retorno a fase crônica; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda, LMC-FC: leucemia mielóide crônica em fase blástica.

Um trabalho conduzido pelo SWOG (*Southwest Oncology Group Study*),⁹⁰ incluindo 226 pacientes com LMA, mostrou resultados animadores com relação à modulação clínica do fenômeno MDR. Nesse estudo, os pacientes foram randomizados para receberem ara-c + daunorrubicina associados ou não à CSA. Embora a taxa de remissão completa (RC) não tenha sido significativamente superior no grupo tratado com CSA (39% *versus* 33%, $p = .14$), a sobrevida livre de recaída (34% *versus* 9%, $p = .031$) e a sobrevida global (22% *versus* 12%, $p = .046$) foram significativamente aumentadas no grupo que recebeu CSA. Também, de importância nesse trabalho foi a análise da correlação entre a detecção da Pgp *in vitro* com a resposta ao tratamento clínico. O efeito da CSA na sobrevida foi maior em pacientes com níveis de expressão da Pgp moderados ou elevados (média de 12 meses com CSA *versus* 4 meses para o grupo sem CSA) comparado com aqueles que exibiam níveis de expressão da Pgp baixo ou ausente (média de seis meses em ambos os grupos).⁹⁰

Sabe-se que a CSA pode alterar a eliminação hepatobiliar da bilirrubina, além do efeito inibidor da Pgp.⁹⁴ No estudo do SWOG observou-se hiperbilirrubinemia conjugada com maior frequência no grupo de pacientes tratados com CSA (31% *versus* 4%; $p < 0,001$). Entretanto, tal achado foi transitório em todos os casos, apesar de algumas vezes ser acentuado. Outras manifestações tóxicas incluíram estomatite, náusea e aumento da creatinina. Estas, no entanto, não foram superiores no grupo tratado com CSA. Da mesma forma, não se observou diferença na taxa de mortalidade nos dois grupos de pacientes. Estes são pontos importantes para ressaltar, pois estudos anteriores conduzidos pelo ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*)⁹⁵ e o CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*)⁹⁶ interromperam precocemente o protocolo terapêutico devido à falta de benefício ou toxicidade inaceitável.

Mais recentemente, o CALGB conduziu um trabalho para o tratamento da leucemia mielóide aguda (LMA) em pacientes com idade superior a 60 anos, previamente

não tratados.⁹³ Esse estudo, randomizado fase III, consistiu de daunorubicina e etoposido associados ao ara-c com ou sem PSC-833. Os pacientes randomizados para receberem quimioterápicos associados ao PSC-833 receberam doses menores da daunorubicina e do etoposido devido aos efeitos farmacocinéticos do PSC-833 (que podem potencializar o efeito dos quimioterápicos, substratos da Pgp). A redução da dose foi baseada em estudo anterior fase I do mesmo grupo CALGB.⁹⁷ Apesar dos trabalhos anteriores fase I e II, também empregando PSC-833 em pacientes com LMA, terem demonstrado resultados promissores,^{98,99} o estudo fase III do CALGB foi interrompido antes do tempo previsto devido à alta taxa de mortalidade precoce no grupo que recebeu PSC-833 em comparação com o grupo que recebeu somente quimioterapia (44% *versus* 20%).

Levando-se em conta que *in vivo* o efeito inibidor do fenômeno MDR com o PSC-833 é mais potente que a ciclosporina,¹⁰⁰ uma grande expectativa começou a surgir com relação aos estudos fase III contendo este agente. Entretanto, também com relação à taxa de remissão completa (RC), os resultados do CALGB não foram animadores: 46% de RC no grupo tratado sem PSC-833 *versus* 39% de RC no grupo que recebeu PSC-833 (Tabela 2).

Mais recentemente, o SWOG conduziu outro trabalho randomizado⁹¹ em 73 pacientes com leucemia mielóide crônica na fase blástica (LMC-FB). Os pacientes foram tratados com ara-c e daunorubicina com ou sem CSA. O tratamento com CSA não melhorou a taxa de RC como também não melhorou a taxa do retorno da LMC-FB para a fase crônica. No entanto, o estudo demonstrou que Pgp tem relevância prognóstica na LMC-FB.

Embora os resultados desapontadores observados em alguns estudos possam reduzir o nosso entusiasmo com respeito à modulação clínica, é muito provável que uma interrupção das pesquisas clínicas nessa área seja prematura. Os resultados pré-clínicos claramente demonstram que modulação da MDR é factível. Além disso, trabalhos como o do SWOG,⁹⁰ conduzidos com um grande número de pacientes, podem indicar que outras respostas clínicas satisfatórias (além da remissão) podem ser obtidas tais como o aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Os diferentes resultados clínicos encontrados nos diversos trabalhos realizados podem ser explicados por uma série de fatores tais como observado na Tabela 3. A inibição da Pgp pode acentuar a citotoxicidade em

alguns órgãos que expressam essa proteína como consequência do acúmulo do quimioterápico intracelular. Como resultado, a toxicidade medular, renal ou hepática poderá ser inaceitável. Um motivo freqüente de resultados clínicos conflitantes é o uso de metodologias diferentes para caracterizar o fenótipo MDR, dificultando a análise dos trabalhos publicados. De forma ideal, os estudos clínicos atuais devem incorporar, em paralelo, a análise *in vitro* das moléculas envolvidas com o fenômeno MDR, preferencialmente também com a análise do papel de agentes reversores.

Concluindo, os estudos envolvendo a modulação clínica da MDR ainda não apresentaram os resultados originalmente esperados. A variabilidade interindividual das respostas ao tratamento, a toxicidade obtida em combinação com certos quimioterápicos e o fato de muitas vezes o fenômeno MDR ser multifatorial, não se limitando à Pgp ou MRP, sugere que as estratégias clínicas deverão ser mais complexas e que a prevenção ou retardamento do desenvolvimento da resistência adicionando reversores como a CSA ao tratamento inicial talvez seja outro tipo de estratégia terapêutica a ser considerada.

Tabela 3. Possíveis causas de falência na modulação clínica do fenótipo MDR.

Fator	Causas de Falência
Agente modulador	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Concentração plasmática inadequada ◆ Interações farmacocinéticas com outras drogas
Quimioterápico	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Concentração plasmática inadequada ◆ Forma de administração (<i>bolus</i>, infusão contínua)
Paciente	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Idade avançada ◆ Toxicidade clínica não tolerada ◆ Falta de grupo controle apropriado ◆ Estado clínico, co -morbidades ◆ Número de pacientes inadequado para análise
Teste laboratorial	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Escolha inapropriada do teste (expressão do gene e da proteína ao invés de estudo funcional) ◆ <i>Cut off</i> inadequado
Neoplasia	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Nível de expressão e efluxo da Pgp ◆ Co-expressão de moléculas MDR ◆ Tipo de célula tumoral (outros mecanismos de resistência) ◆ Fase da doença (recaídas, LMC em fase blástica)

AGRADECIMENTOS

À Barbara Willi e Anna Suter, representantes da Novartis Pharma AG, pela doação de CSA e seus análogos. Este trabalho teve o financiamento do CNPq e PRONEX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gottesman MM, Pastan Y. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
2. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J* 1989;3:2583-92.
3. Juliano RL, Ling LA. Surface glycoprotein modulation drug permeability Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta* 1976;455:152-62.
4. Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986;47:371-80.
5. Bellamy WT. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:161-83.
6. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67-113.
7. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650-4.
8. Muller M, Meyer C, Zaman GJR, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, et al. Overexpression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994;91:13033-7.
9. Zaman GJR, Lankelma J, Van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, et al. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:7690-4.
10. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, Van-Heifningen THM, et al. Overexpression of a M(r) 110.000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 1993;53:1475-9.
11. Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovack ML, Pinedo HM, et al. The drug resistance related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1995;1:578-82.
12. Lee J, Scala S, Matsumoto Y, Dickstein B, Robey R, Zhan Z, et al. Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. *J Cell Biochem* 1997;65:513-26.
13. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998;58:5337-9.
14. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 1999;59:8-13.
15. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981;41:1967-72.
16. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1982;42:4730-3.
17. Germann U, Ford P, Shlyakhter D, Shlyakhter D, Mason V, Harding M. Chemosensitization and drug accumulation effects on VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs* 1997;8:141-55.
18. Ramu A, Ramu N. Reversal of multidrug resistance by phenothiazines and structurally related compounds. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992;30:165-73.
19. Slater LM, Sweet P, Stupecky M, Wetzel MW, Gupta S. Cyclosporin A corrects daunorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma. *Br J Cancer* 1986;54:235-8.
20. Twentyman PR. Cyclosporin as drug resistance modifiers. *Biochem Pharmacol* 1992;43:109-17.
21. Diah SK, Smitherman PK, Aldridge J, Volk EL, Schneider E, Townsend AJ, et al. Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins. *Cancer Res* 2001;61:5461-7.
22. Boesch D, Muller K, Pourtier-Manzanedo A, Loor F. Restoration of daunomycin retention in multidrug-resistant P388 cells by submicromolar concentrations of SDZ PSC 833, a nonimmunosuppressive cyclosporin derivative. *Exp Cell Res* 1991;196:26-32.
23. Watanabe T, Tsuge H, Oh-Hara T, Naito M, Tsuruo T. Comparative study on reversal efficacy of SDZ PSC 833, Cyclosporin A and Verapamil on multidrug resistance "in vitro" and "in vivo". *Acta Oncol* 1995;34:235-41.
24. Goldstein LJ. Clinical reversal of drug resistance. *Curr Probl Cancer* 1995;19:70-123.
25. Toffoli G, Simone F, Corona G, Raschack M, Cappelletto B, Gigante M, et al. Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1245-55.
26. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res* 1993;53:4595-602.
27. Boer R, Gekeler V. Chemosensitizers in tumor therapy: new compounds promise better efficacy. *Drugs Future* 1995;20:499-509.
28. de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE.

- Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* 1999;146:117-26.
29. Dantzig A, Shepard R, Cao J, Law KL, Ehlhardt WJ, Baughman TM, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropylidibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Res* 1996;56:4171-9.
 30. Peck RA, Hewett T, Harding MW, Wang YM, Chaturvedi PR, Bhatnagar A, et al. Phase I and pharmacokinetics study of the novel MDR 1 and MRP 1 inhibitor biricodar administered alone and in combination with doxorubicin. *J Clin Oncol* 2001;19:3130-41.
 31. Solary E, Caillot D, Chauffert B, Casasnovas RO, Dumas M, Maynadie M, et al. Feasibility of using quinine, a potential multidrug resistance-reversing agent, in combination with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukaemia. *J Clin Oncol* 1992;10:1730-6.
 32. Trump DL, Smith DC, Ellis PG, Rogers MP, Schold SC, Winer EP, et al. High dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance reversal agent. Phase I trial in combination with vinblastine. *J Natl Cancer Ins* 1992;84:1811-6.
 33. Bissett D, Kerr DJ, Cassidy J, Meredith P, Traugott U, Kaye SB. Phase I and pharmacokinetic study of D-verapamil and doxorubicin. *Br J Cancer* 1991;64:1168-71.
 34. Versantvoort CH, Broxterman HJ, Lankelma J, Feller N, Pinedo HM. Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpression human small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1994;48:1129-36.
 35. Gollapudi S, Kim CH, Tran BN, Sangha S, Gupta S. Probenecide reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40:150-8.
 36. Chuman Y, Chen ZS, Seto K, Sumizawa T, Furukawa T, Tani A, et al. Reversal of MRP-mediated vincristine resistance in KB cells by buthionine sulfoximine in combination with PAK-104P. *Cancer Lett* 1998;129:69-76.
 37. Kitazono M, Okumura H, Ikeda R, Sumizawa T, Furukawa T, Nagayama S, et al. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int J Cancer* 2001;91:126-31.
 38. Sumizawa T, Chen ZS, Chuman Y, Seto K, Furukawa T, Haraguchi M, et al. Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated drug resistance by the pyridine analog PAK-104P. *Mol Pharmacol* 1997;51:399-405.
 39. Colombani PM, Robb A, Hess AD. Cyclosporine A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes. *Science* 1985;228:337-9.
 40. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-15.
 41. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T - lymphocyte activation. *Nature* 1992;357:695-7.
 42. Gotherl SF, Marahiel MA. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:423-36.
 43. Dawson TM, Steiner JP, Lyons WE, Fotuhi M, Blue M, Snyder SH. The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin. *Neuroscience* 1994;62:569-80.
 44. Cacalano NA, Chen BX, Cleveland WL, Erlanger BF. Evidence for a functional receptor for cyclosporin A on the surface of lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:4353-7.
 45. Le-Hir M, Su Q, Weber L, Woerly G, Granelli-Piperno A, Ryffel B. In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins. *Lab Invest* 1995;73:727-33.
 46. Cameron AM, Steiner JP, Kaplin AI, Walensky LD, Snyder SH. Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5 triphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:1784-8.
 47. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem* 1996;271:2185-92.
 48. Goldner FM, Patrick JW. Neuronal localization of the cyclophilin A protein in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1996;372:283-93.
 49. Damaso CRA, Moussatché N. Inhibition of vaccinia virus replication by cyclosporin A analogues correlates with their affinity for cellular cyclophilins. *J Gen Virol* 1998;79:339-46.
 50. Arceci RJ, Stieglitz K, Bierer BE. Immunosuppressants FK506 and rapamycin function as reversal agents of the multidrug resistance phenotype. *Blood* 1992;80:1528-36.
 51. Rumjanek VM, Lucena M, Campos MM, Marques-Silva VM, Maia RC. Multidrug resistance in leukaemias: the problem and some approaches to its circumvention. *Ciênc Cult* 1994;46:63-9.
 52. Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, Meletti-de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Ciênc* 2001;73:57-69.
 53. Tsuruo T, Iida H, Ohkochi E, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Establishment and properties of a vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. *Jpn J Cancer Res* 1983;74:751-8.
 54. Neyfakh AA. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the studies of multidrug resistance. *Exp Cell Res* 1988;174:168-76.
 55. Pétriz J, García-López J. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia*

- 1997;11:1124-30.
56. Maia RC, Wagner K, Cabral RH, Rumjanek VM. Heparin reverses rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells. *Cancer Lett* 1996;106:101-8.
 57. Maia RC, Silva EAC, Harab RC, Lucena M, Pires V, Rumjanek VM. Sensitivity of vincristine-sensitive K562-Lucena 1 cells to anthracyclines and reversal of multidrug resistance. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:467-72.
 58. Orind M, Wagner-Souza K, Maia RC, Rumjanek VM. Modulation of P-glycoprotein on tumour cells. In: Sotelo JR, Benech JC, editors. *Calcium and cellular metabolism: transport and regulation*. Plenum Publishing; 1997. p. 117-24.
 59. Maia RC, Vasconcelos FC, Harab RC, Coelho AM, Dobbin JA, Rumjanek VM. Comparison between anthracyclines and rhodamine-123 accumulation in chronic lymphoid leukemia: effect of cyclosporin A and verapamil. *Tumor Biol* 1998;19:41-51.
 60. Pilarski LM, Yatscuff RW, Murphy GF, Belch AR. Drug resistance in multiple myeloma: cyclosporin A analogues and their metabolites as potential chemosensitizers. *Leukemia* 1998;12:505-9.
 61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 62. Mizuno K, Furuhashi Y, Misawa T, Iwata M, Kawai M, Kikkawa F, et al. Modulation of multidrug resistance by immunosuppressive agents: cyclosporin analogues, FK506 and mizoribine. *Anticancer Res* 1992;12:21-5.
 63. Jiang XR, Kelsey SM, Wu YL, Newland AC. Circumvention of P-glycoprotein-mediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC 833. *Br J Haematol* 1995;90:375-83.
 64. Tanaka K, Hirai M, Tanigawara Y, Yasuhara M, Hori R, Ueda K, et al. Effect of cyclosporin A analogues and FK506 on transcellular transport of daunorubicin and vinblastine via P-glycoprotein. *Pharmacol Res* 1996;13:1073-7.
 65. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product, P-glycoprotein, in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7735-8.
 66. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein, P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 1989;37:159-64.
 67. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:695-8.
 68. Schinkel AH, Smit JJM, van Telling O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse *mdr 1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to an increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77:491-502.
 69. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Borst P. Absence of the *mdr 1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995;96:1698-705.
 70. Didier AD, Loor F. Decreased biotolerability for ivermectin and cyclosporin A in mice exposed to potent P-glycoprotein inhibitors. *Int J Cancer* 1995;63:263-7.
 71. Mayer U, Wagenaar E, Dorobek B, Beijnen JH, Borst P, Schinkel AH. Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC 833. *J Clin Invest* 1997;100:2430-6.
 72. Marques-Santos LF, Bernardo RR, de Paula EF, Rumjanek VM. Cyclosporin A and trifluoperazine, two resistance-modulating agents, increase ivermectin neurotoxicity in mice. *Pharmacol Toxicol* 1999;84:125-9.
 73. Letrent SP, Polli JW, Humphreys JE, Pollack GM, Brouwer KR, Brouwer KL. P-glycoprotein mediated transport of morphine in brain capillary endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1999;58:951-7.
 74. Ozols RF, Cunnion RE, Klecker RW, Hamilton TC, Ostchega Y, Parrillo JE, et al. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 1987;5:641-7.
 75. Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, Scheper RJ, Durie BG, Taylor CW, et al. Drug resistance in multiple myeloma and non-Hodkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1989;4:415-24.
 76. Salmon SA, Dalton WS, Grogan TM, Plezia P, Lehnert M, Roe DJ, et al. Multidrug resistance in myeloma: laboratory and clinical effects of verapamil as a chemosensitizer. *Blood* 1991;1:44-50.
 77. Raderer M, Scheithauer W. Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance: a literature review. *Cancer* 1993;15:3553-63.
 78. Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40 Suppl:S13-9.
 79. Sandor V, Wilson W, Fojo T, Bates SE. The role of MDR-1 in refractory lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1997;28:23-31.
 80. Chauncey TR. Drug resistance mechanisms in acute leukemia. *Curr Opin Oncol* 2001;13:21-6.
 81. Toppmeyer D, Seidman AD, Pollak M, Russell C, Tkaczuk K, Verma S, et al. Safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor Incel (biricodar; VX-710) in combination with paclitaxel for advanced breast cancer refractory to paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2002;8:670-8.
 82. Warner E, Tobe SW, Andrulis IL, Pei Y, Trachtenberg J,

- Skorecki KL. Phase I-II study of vinblastine and oral cyclosporin A in metastatic renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1995;18:251-6.
83. Toffoli G, Sorio R, Gigante M, Corona G, Galligioni E, Boiocchi M. Cyclosporin A as a multidrug-resistant modulator in patients with renal cell carcinoma treated with teniposide. *Br J Cancer* 1997;75:715-21.
84. Maia RC, Noronha H, Vasconcelos FC, Rumjanek VM. Interaction of cyclosporin A and etoposide. Clinical and in vitro assessment in blast phase of chronic myeloid leukaemia. *Clin Lab Haematol* 1997;19:215-7.
85. Maia RC, Carriço MK, Klumb CENP, Noronha H, Coelho AM, Vasconcelos FC, et al. Clinical approach to circumvention of multidrug resistance in refractory leukemic patients: association of cyclosporin with etoposide. *Exp Clin Cancer Res* 1997;16:419-24.
86. Damiani D, Michieli M, Ermacora A, Russo D, Fanin R, Zaja F, et al. Adjuvant treatment with cyclosporin A increases the toxicity of chemotherapy for remission induction in acute non-lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1998;12:1236-40.
87. Sonneveld P, Suci S, Weijermans P, Beksac M, Neuwirtova R, Solbu G, et al. Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-HOVON randomized phase III study. *Br J Haematol* 2001;115:895-902.
88. Lacayo NJ, Lum BL, Becton DL, Weinstein H, Ravindranath Y, Chang MN, et al. Pharmacokinetic interactions of cyclosporine with etoposide and mitoxantrone in children with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:920-7.
89. Marie JP, Bastie JN, Coloma F, Suberville AMF, Delmer A, Ripo B, et al. Cyclosporin A as a modifier agent in the salvage treatment of acute leukemia. *Leukemia* 1993;7:821-4.
90. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001;98:3212-20.
91. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Slovak ML, Douer D, et al. Cyclosporin inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia blast phase. *Blood* 2002;100:1910-2.
92. Bassan R, Lerede T, Borleri G, Chiodini B, Rossi A, Buelli M, et al. Phase I trial with escalating doses of idarubicin and multidrug resistance reversal by short-course cyclosporin A, sequential high-dose cytosine arabinoside, and granulocyte colony-stimulating factor for adult patients with refractory acute leukemia. *Haematologica* 2002;87:257-63.
93. Baer MR, George SL, Dodge RK, O'Loughlin KL, Minderman H, Caligiuri MA, et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002;100:1224-32.
94. Booth CL, Brouwer KR, Brouwer KL. Effect of multidrug resistance modulators on the hepatobiliary disposition of doxorubicin in the isolated perfused rat liver. *Cancer Res* 1998;58:3641-8.
95. Advani R, Saba HI, Tallman MS, Rowe JM, Wiernik PH, Ramek J, et al. Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia with combination chemotherapy plus the multidrug resistance modulator PSC833 (valsopodar). *Blood* 1999;93:787-95.
96. Baer MR, George SL, Dodge RK, O'Loughlin KL, Minderman H, Caligiuri MA, et al. Phase III study of PSC833 modulation of multidrug resistance (MDR) in previously untreated acute myeloid leukemia (AML) patients (CALGB9720) [abstract]. *Blood* 1999;94:383a.
97. Lee EJ, George SL, Caligiuri M, Szatrowski TP, Powell BL, Lemke S, et al. Parallel phase 1 studies of daunorubicin given with cytosine arabinoside and etoposide with or without the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age with acute myeloid leukemia: results of Cancer and Leukemia Group B Study 9420. *J Clin Oncol* 1999;17:2831-9.
98. Visani G, Milligan D, Leoni F, Chang J, Kelsey S, Marcus R, et al. Combined action of PSC 833 (valsopodar), a novel MDR reversing agent, with mitoxantrone, etoposide and cytarabine in poor-prognosis acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;115:764-71.
99. Dorr R, Karanes C, Spier C, Grogan T, Greer J, Moore J, et al. Phase I/II study of the P-glycoprotein modulator PSC833 in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2001;19:1589-99.
100. Tidefelt U, Lilemark J, Gruber A, Liliemark E, Sundman-Engberg B, Juliusson G, et al. P-glycoprotein inhibitor valsopodar (PSC833) increases the intracellular concentrations of daunorubicin in vivo in patients with P-glycoprotein-positive acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:1837-44.