



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA

DEL TRANSPORTADOR DE

MEMBRANA ABCG2 CON EL

ANTITUMORAL AFATINIB:

IMPORTANCIA EN LA

MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS

PHARMACOLOGICAL INTERACTION

OF THE MEMBRANE TRANSPORTER

ABCG2 WITH THE ANTITUMOR

AFATINIB: IMPORTANCE IN

MULTIDRUG RESISTANCE

Autor: ANDRÉS L. CORREA SÁNCHEZ

GRADO EN BIOLOGÍA

Septiembre, 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Criterios de selección y limitación de la búsqueda.....	7
3.2. Motores y términos de búsqueda	7
3.3. Proceso de análisis, selección y resultados de la información	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4.1. Caracterización de los transportadores ABC	8
4.1.1. Transportadores ABC en MDR	10
4.1.2. Transportador ABCG2/BCRP	11
4.1.2.1. Localización y función fisiológica del transportador BCRP	11
4.1.2.2. Estructura y actividad del transportador BCRP	13
4.1.2.3. Mecanismo de acción, sustratos e inhibidores del transportador BCRP	15
4.1.2.4. Expresión del transportador BCRP en cáncer	17
4.1.2.5. Polimorfismos genéticos del transportador BCRP	17
4.1.2.6. Transportador BCRP y quimioterapia.....	18
4.2. Proteínas tirosina quinasa e inhibidores de tirosina quinasa	19
4.3. Afatinib.....	20
4.3.1. Mecanismo de acción de Afatinib en la interacción con los receptores de crecimiento epidérmico.....	21
4.3.2. Interacciones entre el transportador BCRP y afatinib.....	21
4.3.2.1. Afatinib, regulador indirecto de la expresión de BCRP.....	21
4.3.2.2. Afatinib, regulador directo de la expresión y actividad de BCRP	22
4.3.2.3. Perspectivas y retos de afatinib	24
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN

El cáncer es uno de los grupos de enfermedades que mayor mortalidad tiene en el mundo. Muchos cánceres tienen la capacidad innata de evolucionar a formas más agresivas. Una de las causas reconocidas de esta rápida evolución es el desarrollo de multirresistencia ante determinados fármacos debido a la sobreexpresión de transportadores de la familia ABC, especialmente ABCG2/BCRP, considerado un marcador de la diagnosis y prognosis de diversas neoplasias.

En el presente trabajo, se realiza una recopilación bibliográfica de la función que desempeña el transportador ABCG2/BCRP en la multirresistencia en cáncer, estudiando desde varios ángulos los diferentes aspectos del transportador, y el origen de la multirresistencia.

Asi mismo, se estudian las interacciones de este transportador con afatinib, un inhibidor de receptores tirosina quinasa aprobado por la FDA como fármaco anticancerígeno.

Afatinib se ha postulado como una alternativa eficaz, potente y específica, capaz de evitar la multirresistencia farmacológica en cáncer e inducir regresión tumoral. Diversos estudios han demostrado que tiene la facultad de interactuar con el transportador BCRP actuando de forma dual ante él, bien siendo sustrato, o bien siendo un inhibidor modulador de la expresión, transporte y actividad del transportador en diversas líneas celulares de cáncer.

Palabras clave: cáncer, multirresistencia, transportadores ABC, ABCG2/BCRP, receptores de tirosina quinasa, afatinib.

ABSTRACT

Cancer is one of the groups of diseases with the highest mortality in the world. Many cancers have the innate capacity to evolve to more aggressive forms. One of the reasons for this rapid evolution is the development of multidrug resistance due to the overexpression of transporters of the ABC family, especially ABCG2/BCRP, considered a marker for the diagnosis and prognosis of various neoplasms. In the following report, a bibliographic compilation of the role played by the ABCG2/BCRP transporter in multidrug resistance in cancer is carried out, studying from several perspectives the different aspects of the transporter, and the origin of multidrug resistance.

The interactions of this transporter with afatinib, a receptor tyrosine kinase inhibitor approved by the FDA as an anticancer drug, are also studied.

Afatinib has been postulated as an effective, potent and specific alternative, capable of avoiding multidrug resistance in cancer and inducing tumor regression. Several studies have shown that it has the ability to interact with the BCRP transporter acting in a dual manner, either as a substrate or as an inhibitor modulating the expression, transport and activity of the transporter in various cancer cell lines.

Key words: cancer, multidrug resistance, ABC transporters, ABCG2/BCRP, tyrosine kinase receptors, afatinib.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades que pueden tener lugar en cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando se da un crecimiento incontrolable de sus células. Estas además tienen la capacidad de invadir partes contiguas del cuerpo y diseminarse a través de órganos y tejidos (Organización mundial de la salud, 2021). Constituye en la actualidad una de las principales causas de mortalidad en Europa, así como en el resto del mundo. La mayoría de los estudios estadísticos advierten que tanto la incidencia de la enfermedad como la mortalidad mantendrán su tendencia alcista a lo largo de los próximos años. De acuerdo con los últimos datos emitidos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud, se estimó que en el año 2020 la mortalidad mundial por cáncer en ambos sexos ascendió a 9.9 millones de individuos. Dentro de esta cifra, el 19.6 %, unos 1.9 millones de individuos eran europeos, de los cuales, la población española acumuló una mortalidad del 5.7 % (113.054 habitantes). Las mismas fuentes estiman que para el año 2040 el índice de nuevos casos a nivel mundial ascenderá desde los 19.3 millones hasta los 30.2 millones de personas (Fig 1).

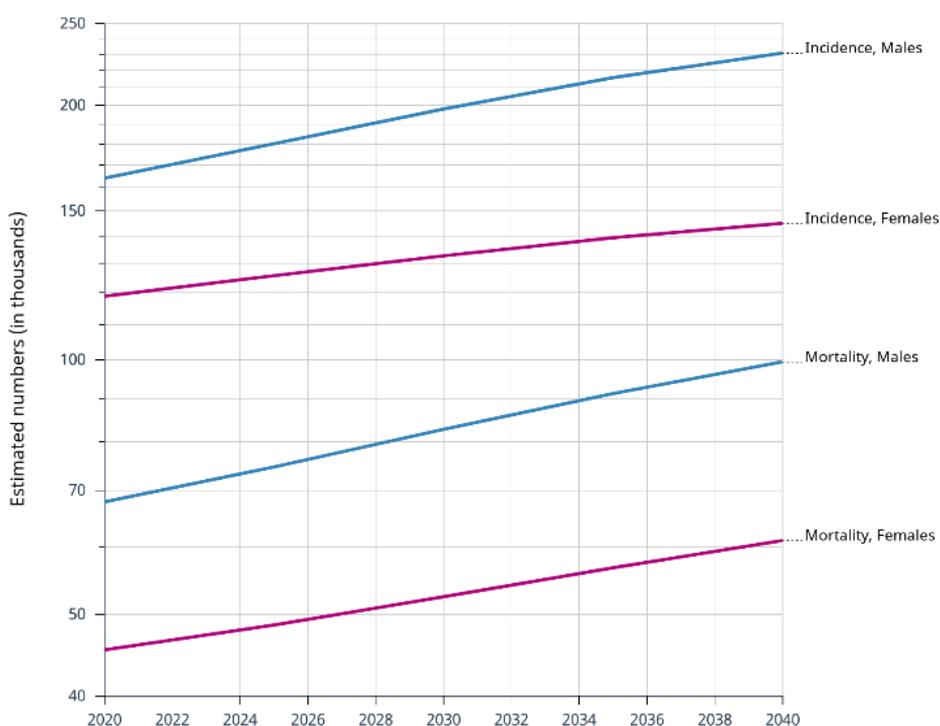


Fig 1. Estimación de la incidencia y la mortalidad de cáncer en ambos sexos para el año 2040 (Organización mundial de la salud, 2021).

Aunque las cifras son preocupantes, hoy por hoy el cáncer es tratable gracias a los continuos avances científicos; sin embargo, un porcentaje cada vez más elevado de los cánceres muestran procesos de adaptación ante diversas terapias, lo cual, en último término llega a lastrar

la prognosis, la diagnosis, así como el tratamiento de los pacientes afectados. Esta resistencia constituye un reto clínico y es por ello por lo que la profundización en este fenómeno contribuirá a aclarar los mecanismos por los cuales se presenta ante un amplio abanico de fármacos.

Multirresistencia a fármacos

La multirresistencia ante fármacos (MDR) definida como la capacidad de los tumores a mostrar una resistencia simultánea ante agentes quimioterapéuticos estructural y funcionalmente no relacionados (Krishna y Mayer, 2000) es un fenómeno multifactorial extremadamente complejo, resultado de un conjunto de alteraciones, las cuales tienen su origen en las características intrínsecas del tumor (Gottesman *et al.*, 2016) características del hospedador (Alfarouk *et al.*, 2015) e interacciones entre hospedador-tumor (Alaoui-Jamali *et al.*, 2004) (Fig 2).

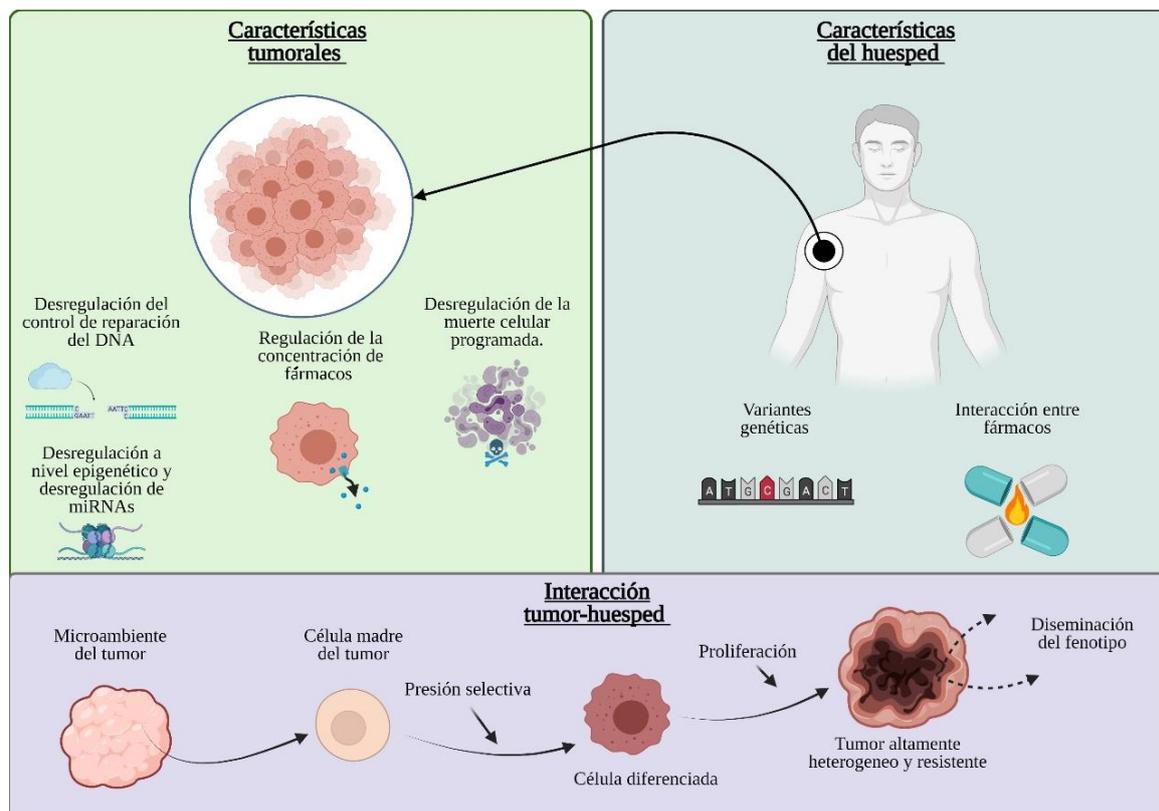


Fig 2. Ilustración de los principales factores implicados en el desarrollo de MDR, así como el desarrollo y diseminación de fenotipos más agresivos de cáncer por interacción de factores entre huésped y tumor.

Según diversas observaciones clínicas, los tumores tienen dos tipos de respuesta ante un fármaco: respuesta de resistencia intrínseca, en la cual una pequeña parte de los cánceres muestran resistencia ante fármacos sin haber estado expuestos a ellos previamente; y respuesta

adquirida, la cual se obtiene cuando se administra un fármaco prolongadamente en el tiempo (Gottesman *et al.*, 2016). Ambas respuestas de resistencia se dan debido a la convergencia de un sinnúmero de factores en tumores altamente heterogéneos e inestables genéticamente (Alaoui-Jamali *et al.*, 2014):

- **Factores del hospedador**

Los factores del hospedador comprenden a las variantes genéticas de cada individuo y, por otro lado, a las interacciones entre fármacos, que en parte dependen de variables sobre las cuales el individuo tiene control y pueden ser modificadas en último término.

Variantes genéticas: Son los principales factores implicados en la variabilidad individual de respuestas de tumores ante un determinado fármaco (Mukerjee *et al.*, 2018). Los que mayor impacto generan son los polimorfismos *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP). Sin embargo, deleciones, sustituciones, translocaciones y repeticiones localizadas en genes que codifican enzimas que metabolizan fármacos, transportadores, sistemas de reparación de DNA, control de ciclo celular, entre otras, son también parte importante del total de variantes que determinan el desarrollo de MDR (Assaraf *et al.*, 2019).

Interacciones entre fármacos: Surgen como consecuencia de la administración de diferentes tipos de fármacos en un tratamiento, para evitar que la elevada heterogeneidad de las poblaciones celulares en los tumores reduzca su efectividad y para impedir que mediante presión selectiva surjan variantes celulares de mayor resistencia (Alfarouk *et al.*, 2015). La administración conjunta de diversos fármacos por norma general conlleva que se generen efectos antagónicos, modificando la farmacocinética (PK) y la farmacodinámica (PD) de los fármacos (Scripture y Frigg, 2006).

Factores como la alimentación, suplementación, variantes ambientales, hábitos de salud, transportadores de fármacos (Scripture y Frigg, 2006), fármacos frente a efectos secundarios (Riechelmann *et al.*, 2007), pH del medio gástrico (Herbrink *et al.*, 2015), enzimas metabolizadoras, entre muchos otros, afectan directamente a la absorción, distribución, metabolismo, excreción, sinergia, antagonismo y adición de los fármacos en los pacientes.

- **Factores del tumor**

Dependen directamente de las características del tumor y del ambiente que le rodea. Uno de los mecanismos más relevantes en el desarrollo de MDR es la capacidad de los tumores de modificar la concentración de los fármacos. Esto es muy importante, ya que, en el

tratamiento del cáncer, la eficacia dependerá de la concentración del fármaco que es capaz de atravesar las diversas barreras fisiológicas hasta llegar a su punto de acción (Mansoori *et al.*, 2017), y también de qué cantidad de daño es capaz de hacer el fármaco cuando llega a la célula, es decir, su grado de toxicidad (Indran *et al.*, 2011). La mayoría de los fármacos logran alcanzar una elevada toxicidad mediante la desregulación de una gran variedad de mecanismos celulares y moleculares (Tarasov *et al.*, 2019). Sin embargo, la elevada heterogeneidad tumoral, así como la constante evolución de las células cancerígenas les ha dotado de la capacidad de eludir estos efectos o adaptarse a ellos (Indran *et al.*, 2011). A través de la modulación de los transportadores de membrana son capaces de incrementar el eflujo, disminuir el influjo y secuestrar los fármacos en vesículas y compartimentos celulares (Peetla *et al.*, 2013).

Junto a la capacidad de regular la concentración intracelular de los fármacos, las células del tumor son capaces de ser sometidas a procesos de presión selectiva y de adaptar su mecanismo molecular; de esta forma pueden ser capaces de:

1º- Desregular mecanismos de muerte celular programada, apoptosis, autofagia etc, bien por disminución de receptores de señales de muerte celular, por desbalance de señales que regulan la muerte celular (Green y Llambi, 2015), o bien por disminución de la actividad de genes supresores de tumores como el gen P53 (Indran *et al.*, 2011).

2º- Alterar el control de la regulación de los sistemas de respuesta al daño del DNA, lo que lleva a generar fenotipos con reparación y tolerancia aumentada. Esto ocurre como una respuesta de resistencia adquirida debido a que muchos fármacos tienen como diana los sistemas de replicación del DNA (Assaraf *et al.*, 2019).

3º- Generar alteraciones a nivel epigenético, así como alterar la regulación de los miRNAs. Ambos mecanismos de regulación de la expresión génica están encargados de la regulación de transportadores de sustratos a través de la membrana (Spitzwieser *et al.*, 2016), de la regulación de genes pre y proapoptóticos (Wilting y Dannenberg, 2012), de la regulación de los sistemas de diferenciación celular y de la regulación de la expresión de genes involucrados en la reparación del DNA (Saghafinia *et al.*, 2018), entre otros.

La alteración de los mecanismos moleculares mencionados previamente lleva al desarrollo de una elevada heterogénea tumoral, la cual es uno de los ejes fundamentales en el desarrollo de MDR. La heterogeneidad no solo se da entre diferentes tumores, sino que, también se genera en el interior del mismo tumor (Burrell *et al.*, 2013), causando de forma directa la elevada variabilidad entre individuos que poseen el mismo tipo de cáncer.

- **Interacción tumor - hospedador**

El microambiente del tumor es el factor más importante en la interacción tumor / hospedador y es el eje central del desarrollo de resistencia ante diferentes fármacos, ya que proporciona un ecosistema extremadamente complejo a la composición y diversidad celular del tumor (Hanahan y Weinberg, 2011). De este modo, el microambiente es el origen de la elevada presión selectiva tumoral, la cual, en última instancia llevará a las células a la expresión de diferentes mecanismos moleculares, tales como, programas de diferenciación o proliferación entre otros (Puram *et al.*, 2018). La vía de adaptación que adoptará una población celular dentro del tumor ante la presión selectiva dependerá de un conjunto de variantes como la disposición de la población en el espacio, la vascularización circundante a la población, el acceso a nutrientes, la vigilancia inmunológica, la presencia de oxígeno (el grado de hipoxia) y el pH del ambiente circundante entre otros (Krishna y Mayer, 2000). Todas estas variantes llevarán especialmente a las células madre del tumor a tomar una vía u otra de diferenciación, las cuales por norma general conllevarán a la generación de formas más agresivas y resistentes de cáncer.

Dentro de estos factores, la hipoxia junto a la acidez son las que mayor aportación generan al grado de presión selectiva. Por un lado, la hipoxia induce la angiogénesis, mejora la capacidad de metástasis, mejora el índice de expansión y proliferación celular, y aporta su grano de arena al desarrollo de quimiorresistencia (Araos *et al.*, 2018).

Por otro lado, la acidez originada por la elevada tasa de glucólisis conduce a la disminución del pH en el microambiente del tumor (Ji *et al.*, 2019) y a la activación de enzimas proteolíticas que remodelan el tejido circundante y permiten la invasión local (Conlon y Murray, 2019). Además, modifica el gradiente de pH entre el medio externo y el citoplasma, lo cual conlleva a retener los fármacos en compartimentos celulares con un pH bajo, como son lisosomas, vesículas y endosomas (Zhitomirsky *et al.*, 2018).

Por último, varios autores afirman que las células que desarrollan un fenotipo resistente en algunos casos tienen la capacidad de secuestrar fármacos en el interior de vesículas gracias al uso de transportadores albergados en la membrana lipídica, los cuales funcionan como puertas para el secuestro de fármacos. Así mismo, se ha encontrado que algunas células usan estas vesículas como medios de diseminación y transportan en su interior transportadores de membrana hacia otras células que no poseen el fenotipo resistente; de cierta forma simulan un efecto pleiotrópico por el cual moldean el fenotipo de los tejidos circundantes (Gong *et al.*, 2013; Gottesman *et al.*, 2016; Namee y O'Driscoll, 2018).

- **Implicación de los transportadores de membrana en el desarrollo de MDR**

Durante muchos años, en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer, muchos de los fármacos administrados a pacientes no eran capaces de acumularse en el interior celular y se desconocían las razones por las cuales pasaba este fenómeno. Se barajaron una serie de suposiciones de entre las cuales se comprobó posteriormente mediante los estudios de Kolata (1986) y Ramu et al., (1989) que en las células cancerígenas existía un sistema de transporte activo por el cual se expulsaban una gran cantidad de sustratos, entre ellos compuestos hidrofóbicos y metabolitos, haciendo que disminuya la concentración de estos en el interior celular. Estos transportadores que ya habían sido previamente descritos en bacterias por Berger y Heppel (1974) y que hoy en día conocemos como transportadores ABC (*ATP binding cassette*) fueron identificados como los causantes de este fenómeno.

Y aunque existe constancia de la implicación de otra serie de transportadores de membrana, como los transportadores de soluto (SLC) en el desarrollo de MDR, los transportadores ABC son los que mayor peso tienen en el desarrollo y progresión de MDR.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es recopilar información sobre la implicación del transportador de membrana ABCG2/ BCRP (*Breast cancer resistance protein*) en el desarrollo de la multirresistencia ante fármacos y las consecuencias de su interacción con los inhibidores de tirosina quinasa, especialmente con el afatinib, utilizados en el ámbito del tratamiento del cáncer.

Para ello, se han delimitado los siguientes objetivos específicos:

- 1º Conocer cuál es la implicación de los transportadores ABC en el desarrollo de MDR.
- 2º Delimitar cual es el aporte de BCRP en el fenotipo resistente de diversos cánceres. Así mismo, conocer su estructura, bioquímica, mecanismos de acción, disposición tisular y sustratos e inhibidores.
- 3º Descubrir cómo afecta la variabilidad étnica en la expresión y funcionalidad de BCRP y además cual es el *background* histórico de este transportador con la quimioterapéutica convencional.
- 4º Investigar en qué consiste el fármaco afatinib y su implicación en el cáncer, además de conocer cómo actúa a nivel molecular y qué relación tiene con el transportador BCRP.

- 5º Definir cuáles son los márgenes de mejora en el tratamiento del cáncer con afatinib y reflexionar sobre su futuro en la oncología.

3. MATERIALES Y MÉTODO

El presente Trabajo de Fin de Grado de carácter bibliográfico ha sido realizado mediante el uso de diversas fuentes de información.

3.1. Criterios de selección y limitación de la búsqueda

Para empezar, primero se definió el marco de estudio y la estructura de la pregunta de investigación, en este caso la pregunta estaba clara; ¿Cuáles son las interacciones del fármaco afatinib con ABCG2?, transportador implicado en el desarrollo de MDR. En cuanto al marco de estudio se delimitaron:

El área temática: en primera instancia cáncer y MDR; según se acotaba el área de búsqueda BCRP/ABCG2 y MDR y por último BCRP/ABCG2 y afatinib.

Los tipos de estudios: Principalmente estudios en oncología molecular, bioquímica molecular, biología molecular, enzimología, cristalografía, farmacocinética, farmacodinámica, farmacogenética, biomédicos entre otros.

Los tipos de documentos: no se descartó ningún tipo de documento que provenga de fuentes fiables; se usaron revisiones, casos clínicos, estudios in vivo e in vitro. Al tratarse de un tema específico no fue de relevancia el impacto de la revista, ni el número de citas que tuvo el artículo.

La limitación del tiempo: Para definir la base del estudio se utilizaron los artículos recientes a la fecha de la realización del trabajo, sin embargo, cuando el estudio se iba acotando y volviéndose más específico se tuvo que ampliar el rango de tiempo debido a la escasez de estudios; además, parte de las bases al mantenerse prácticamente inalteradas en el tiempo fueron estudiadas a partir de los artículos que las describen originalmente.

El Idioma: exclusivamente inglés.

3.2. Motores y términos de búsqueda

Los motores de búsqueda más usados fueron: Elsevier (Science direct (<https://www.sciencedirect.com/>)), la librería nacional de medicina creada por el centro nacional

estadounidense para la información biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Google Scholar (<https://scholar.google.es/>).

Los términos de búsqueda variaron a lo largo de la realización del trabajo, en primer lugar, se empezó buscando información acerca de “*cancer and MDR*”; “*ABC transporters*”; “*ABC structure*”, para pasar a la búsqueda de “*ABCG2/BCRP and MDR*”, “*ABCG2/BCRP molecular structure, inhibitors and substrates*”; por último, se buscó información sobre los receptores de tirosina quinasa e inhibidores. Entre ellos afatinib y su relación con ABCG2 mediante palabras clave como “*Tyrosine Kinase receptors and afatinib*”, “*Relation between afatinib and ABCG2/BCRP*” entre muchas otras.

3.3. Proceso de análisis, selección y resultado de la información

Se hicieron tandas de selección y se designaron 3 bloques de información importante a abordar: MDR - ABCG2/BCRP, receptores de tirosina quinasa y afatinib. Al ser generales se procedió a buscar en los motores de búsqueda aquellas revisiones más atractivas y que abarcasen la mayor cantidad de información relevante. A partir de ellos, la información más valiosa se estudió y revisó, procediendo a su lectura en el artículo original.

Por último, cuando el trabajo se centró en las interacciones afatinib-ABCG2, la selección de artículos se restringió a aquellos artículos que tenían una estricta relación con el tema. Al final, quedaron 56 artículos, en los cuales se estudió la información más relevante con respecto al tema de investigación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los transportadores ABC

La familia de los transportadores de membrana ABC está filogenéticamente muy conservada en seres humanos. Se subdividen en 7 subfamilias con 48 subtipos diferentes de transportadores, desde ABCA hasta ABCG. Poseen un tamaño relativo de entre 600 a 5004 aminoácidos y se organizan basándose en su estructura genética, secuencia de aminoácidos, organización de sus dominios y análisis filogenéticos (Dean, 2005).

Mediante el gasto de energía en forma de ATP se encargan de transportar a través de la membrana una elevada diversidad de sustratos, dentro de los cuales se incluyen azúcares aminoácido, iones metálicos, péptidos, proteínas, compuestos hidrofóbicos y sus metabolitos, etc. Se localizan en una gran diversidad de tejidos realizando una gran diversidad de funciones.

La estructura general del transportador ABC (Fig 3a) está compuesta por dos dominios estructurales citoplasmáticos denominados dominios de unión a nucleótidos (NBD) y dos dominios transmembrana (TMD) los cuales están conformados por seis a 11 α hélices que atraviesan la membrana y que otorgan la especificidad por el sustrato (Choi y Yu, 2014). El transportador funcional puede estar compuesto por una sola proteína con dos NBD y otros dos TMD (transportadores completos), o por un dímero compuesto de dos mitades de transportador.

Los NBD son los encargados de hidrolizar el ATP y provocar modificaciones conformacionales en los dominios TMD, lo cual permite el paso del sustrato a través de la membrana lipídica (Locher, 2016). Los NBD están compuestos por varios motivos estructurales (Fig 3b): Un motivo *P loop*, altamente conservado, rico en glicinas y que se une a los α y β fosfatos del ATP; un motivo *A loop* que proporciona una cadena lateral aromática que se acopla al anillo de purina de la adenina; un motivo Walker B, implicado en la unión e hidrólisis del ATP, posee una secuencia consenso de residuos hidrofóbicos junto a un glutamato, que actúan activando una molécula de agua para realizar un ataque nucleofílico al fosfato del ATP; un motivo especial LSGGQ que fija y orienta al ATP durante la hidrólisis; un interruptor de histidina, el cual estabiliza el estado del cambio de conformación; un *Q loop* que proporciona contacto con la TMD; un *D loop*, el cual tiene un papel en el acoplamiento de la hidrólisis al transporte; y una ranura en la superficie del NBD, la cual forma el sitio de contacto entre las hélices de acoplamiento del TMD (Locher, 2016; Liu, 2019).

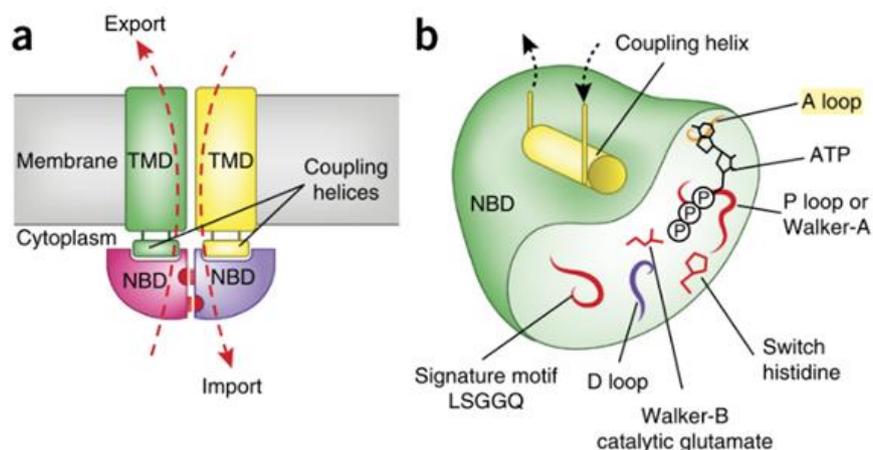


Fig 3. Estructura de los transportadores ABC; 3a) Representación de los dominios transmembranales junto a los dominios de unión a nucleótidos, 3b) Estructura de un NBD donde se señalan todos y cada uno de los motivos mencionados previamente (Locher, 2016).

4.1.1. Transportadores ABC en MDR

De entre la elevada diversidad de transportadores ABC, destacan por su aportación de una u otra manera al origen y la progresión del cáncer los transportadores ABCB1/P-GP (P-glicoproteína), ABCB4/MDR2 (*Multidrug resistance 2*), ABCB11, ABCC1/MRP1 (*Multidrug resistance protein 1*), ABCC2/MRP2, ABCC3/MRP3, ABCC4/MRP4, ABCC5/MRP5, ABCC6/MRP6, ABCC10/MRP7, ABCC11/MRP8 y ABCG2/BCRP (Slot *et al.*, 2011; Mo y Zhang, 2012; Schinkel y Jonker 2012). De entre ellos los transportadores MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1 (Tabla 1) y BCRP/ABCG2 (apartado aparte más adelante) son los que mayor implicación tienen en la modulación de la concentración intracelular de fármacos anticancerígenos y por lo tanto los implicados en el desarrollo de MDR (Housman *et al.*, 2014).

Tabla 1. Disposición tisular, sustratos, función fisiológica e implicación en cáncer de los transportadores MDR1 y MRP1 (Fletcher *et al.*, 2016; Liu, 2019; Turner *et al.*, 2020; Whitlock y Leslie, 2020).

Transportador	Localización tisular	Sustratos	Función fisiológica	Implicación en cáncer
MDR1 (<i>ABCB1</i>) (Fleker <i>et al.</i> , 2016; Liu, 2019; Turner <i>et al.</i> , 2020).	En la membrana apical de epitelios de tejidos como; intestino, cerebro, hígado, testículos, placenta, ojos etc. En células hematopoyéticas del sistema inmune e incluso en membranas mitocondriales y nucleares.	Elevada diversidad de moléculas anfipáticas débiles y ligeramente hidrofóbicas con anillos aromáticos y nitrógenos cargados positivamente, así como compuestos endógenos y exógenos tóxicos etc.	Limita la entrada de compuestos tóxicos a través de las barreras hematocefálica, intestinal, hematotesticular, hematorretinal, fetal-maternal además participa en la excreción hepato-biliar.	Evita la entrada y acumulación de fármacos anticancerígenos hidrofóbicos como colchicina, doxorubicina, vinblastina, inhibidores de tirosin quinasa, entre muchos otros y participa en el desarrollo de MDR en una elevada diversidad de cánceres.
MRP1/ (<i>ABCC1</i>) (Liu, 2019; Whitlock y Leslie, 2020).	En membrana basolateral del epitelio polarizado y en membranas luminal y abluminal de endotelios de diferentes tejidos. Elevada expresión en hígado, pulmón, barrera hematoencefálica, colon, placenta, músculo esquelético, piel, intestino delgado y grueso y en testículos.	Moléculas endógenas señalizadoras como prostaglandina, conjugados de GSH, esfingosinas, glutatión, bilirrubina, ácido fólico, vitamina B-12. Fármacos y xenobióticos.	Detoxificación de fármacos, transporte de glutatión y protección ante tóxicos; por ejemplo, contra compuestos provenientes del arsénico.	Expulsa fármacos antineoplásicos como; vincristina, doxorubicina, metotrexato. Y su sobreexpresión desemboca en una peor prognosis en cáncer de pulmón, neuroblastomas, cáncer de mama, de próstata, etc.

4.1.2. Transportador BCRP/ABCG2

El transportador BCRP/ABCG2 al igual que los demás transportadores ABC se encuentra en una elevada diversidad de tejidos desarrollando un papel importante en la absorción, distribución y eliminación de una gran cantidad de sustratos. Desde que fue descubierto por Doyle *et al* en el año 1998 en una línea celular de cáncer de mama resistente a doxorrubicina, ha sido descrito por gran variedad de estudios como el transportador de mayor relevancia en la interacción farmacológica entre quimioterapéuticos. Su sobreexpresión y sus polimorfismos en diversos tejidos se relacionan con la prognosis y predicción de neoplasias hematopoyéticas y sólidas, así como con el desarrollo de MDR (Mo y Zhang, 2012). Es por ello que es una diana terapéutica de importancia farmacológica.

4.1.2.1. Localización y función fisiológica del transportador BCRP

El transportador BCRP se encuentra en un amplio rango de tejidos especializados en la absorción, distribución y eliminación de fármacos, por lo cual, se le atribuye el papel de protector farmacológico y toxicológico ante xenobióticos y endobióticos, limitando la biodisponibilidad de sus sustratos en tejidos que actúan como barreras fisiológicas, tales como: la barrera hematoencefálica, células epiteliales de intestino, riñón, vellosidades coriónicas de la placenta, membrana canalicular de hepatocitos, células alveolares de la glándula mamaria y en células madre (Fig 4) (Mao y Unadkat, 2005; Sarkadi *et al.*, 2006; Mo y Zhang, 2012; Liu, 2019).

En el tracto gastrointestinal (GT): Se expresa principalmente en la membrana apical de los enterocitos de las vellosidades intestinales, tanto en intestino delgado como en grueso (Fig 4 A), en los cuales, actúa como una bomba de eflujo disminuyendo la absorción intestinal y, por lo tanto, la biodisponibilidad de sustratos (Lee *et al.*, 2015; Mao y Unadkat, 2015). Su expresión es máxima en duodeno (Gutmann *et al.*, 2005); sin embargo, también se encuentra dispuesto en la membrana luminal de células epiteliales del resto del intestino y colon, aunque su expresión en estos últimos es menor (An y Morris, 2020).

En hígado: Principalmente en la membrana canalicular de hepatocitos del canalículo biliar, donde actúa como una bomba de eflujo que transporta metabolitos tóxicos y xenobióticos desde los hepatocitos hasta la bilis (Fig 4 B). Los sustratos endógenos están principalmente constituidos por conjugados glucurónicos (Mo y Zhang, 2012; Liu, 2019; An y Morris, 2020).

En la barrera hematoencefálica: Localizado en la membrana luminal del endotelio microvascular, (Fig 4 C); allí el transportador actúa protegiendo al cerebro de la entrada de xenobióticos tóxicos e impide que se acumulen en el cerebro (Cooray *et al.*, 2002; Aronica *et al.*, 2005; Mo y Zhang, 2012).

En la placenta: forma parte de la barrera materno fetal y se encuentra localizado en las vellosidades coriónicas y en la membrana plasmática de sincitiotrofoblasto. Está dispuesto frente al riego sanguíneo materno (Fig 4 D) (Litman *et al.*, 2002; Mao y Unadkat, 2015) donde su función principal es evitar la entrada de compuestos tóxicos al feto (Mo y Zhang, 2012).

En glándulas mamarias: está presente en la parte apical membranar de los conductos y lóbulos de las mamas (Fig 4 E) (Liu, 2019). Experimentos realizados en ratones *knock out* han demostrado que el transportador ABCG2 es importante en la disposición de diferentes sustratos en leche materna (Merino *et al.*, 2005; Merino *et al.*, 2006).

En médula ósea y otros tejidos no hematopoyéticos: específicamente en las membranas de células madre hematopoyéticas de médula (Fig 4 F) y de órganos no hematopoyéticos como corazón, piel, pulmones, riñón, entre otros (Fatima *et al.*, 2012; Mo y Zhang, 2012).

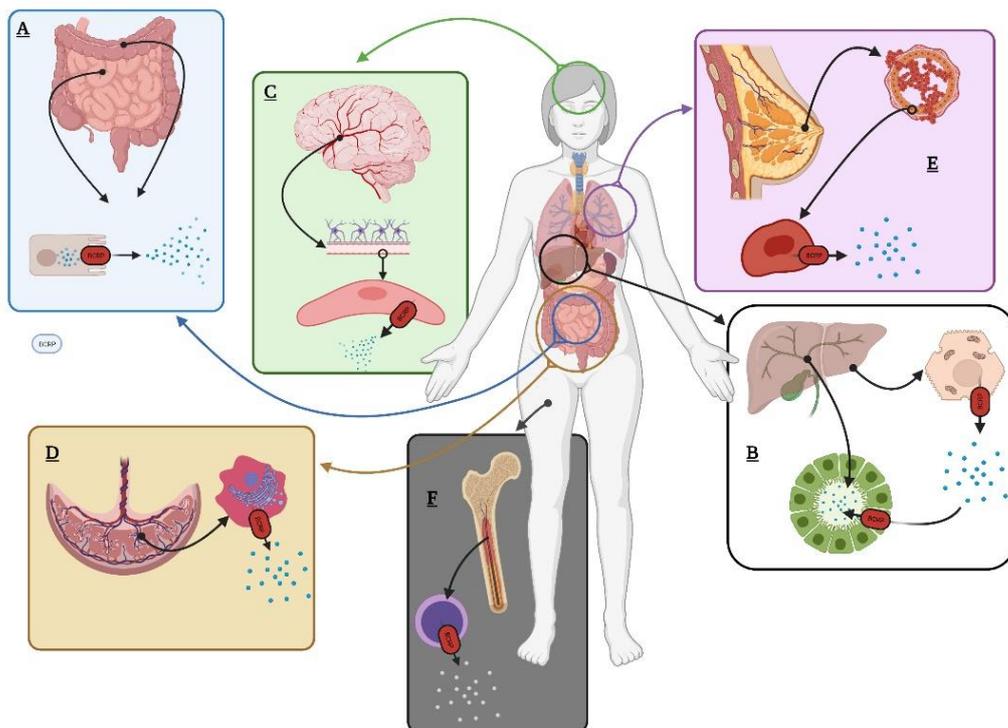


Fig 4. Distribución de la máxima expresión tisular del transportador BCRP en un individuo sano. 4 A) en los enterocitos del GT. 4 B) en los hepatocitos del hígado. 4 C) en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. 4 D) en las células del sincitiotrofoblasto de la placenta. 4 E) en las vellosidades coriónicas. 4 F) en las células madre de la médula ósea.

4.1.2.2. Estructura y actividad del transportador BCRP

El transportador BCRP, ilustrado en la Fig 5, a diferencia de los demás transportadores ABC, en estado funcional en la membrana está compuesto por un homodímero de proteínas; cada protómero está constituido por un NBD en el N-terminal y un TMD de seis hélices α que atraviesan la membrana, denominados como TM del 1 al 6 en el C-terminal (Polgar *et al.*, 2008; Sarkadi *et al.*, 2020).

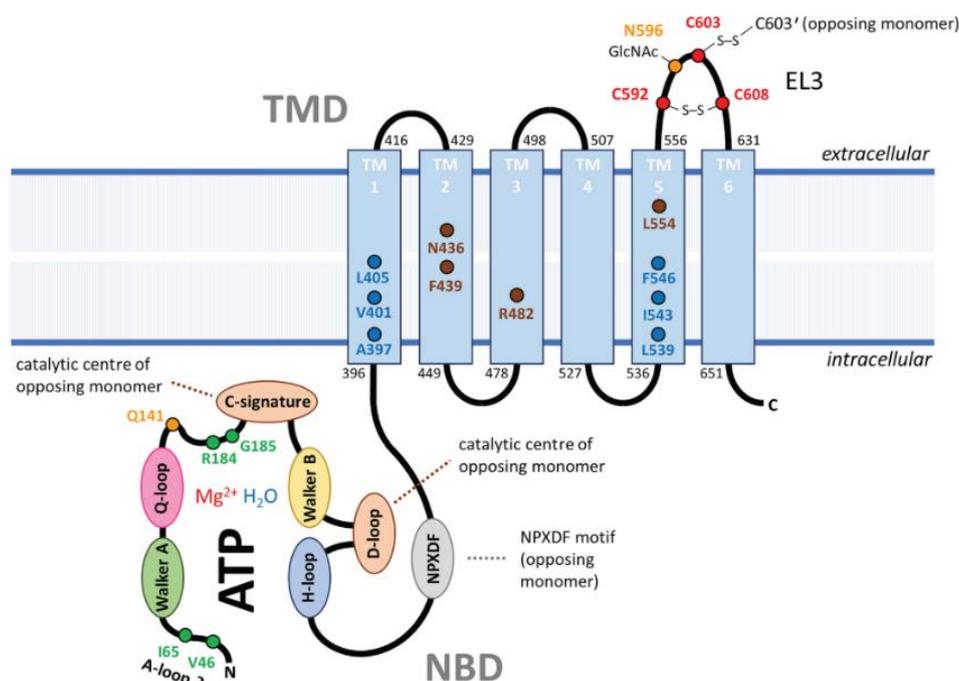


Fig 5. Estructura de un protómero del homodímero BCRP. La estructura está compuesta por los dominios NBD y TMD, los motivos de unión a ATP; Walker A, Walker B, H loop y Q loop junto a los motivos D loop y el motivo C constituyen el NBD. Por otro lado, se esquematiza las TM1-6 de TMD junto a los aminoácidos más importantes, los cuales están representados de diferentes colores; los azules son los residuos implicados en la unión a sustratos hidrofóbicos; los marrones están implicados en la especificidad de unión a sustratos; además en rojo se disponen las cisteínas de EL3 (Eckenstaler y Benndorf, 2020).

Uniendo las hélices transmembranales se disponen un conjunto de bucles extracelulares e intracelulares relativamente cortos, de los cuales, el de mayor tamaño e importancia es el bucle extracelular 3 (EL 3) ubicado entre TM 5 y 6 (Desuzinges- Mandon *et al.*, 2010).

Los NBD de BCRP están altamente conservados a nivel de secuencia y estructura, y constituyen el sitio de unión e hidrólisis a ATP. Al igual que los demás transportadores ABC, NBD de BCRP se encuentra formado por los motivos: Walker B, interruptor de histidina (H loop), D loop, Q loop y motivo C signature (Eckenstaler y Benndorf, 2020). Sin embargo, no poseen el motivo Loop A (Manolaridis *et al.*, 2018).

Los TMD de BCRP, por otro lado, están poco conservados con respecto al resto de familias de ABC; son significativamente más cortos y más rectos, lo cual permite que los NBD estén más cerca de la membrana plasmática (Sarkadi *et al.*, 2020).

El homodímero funcional se establece por la dimerización de los NBDs mediante la unión de dos moléculas de ATP, una en cada NBD y se lleva a cabo de forma complementaria, de tal forma que se llegan a enfrentar los motivos Walker A, Q *loop*, Walker B, H *loop* de NBD1 con C *signature* y P *loop* de NBD2 (Eckenstaler y Benndorf, 2020). Los TMD también forman uniones, el TM 1 interfiere con el TM 2 en el mismo protómero e interaccionan con el TM5 del protómero contiguo; además los TM2, TM5 del TMD1 junto a TM2, TM5 del TMD2 forman uno de los centros de unión a sustratos denominado cavidad 1, constituida principalmente por aminoácidos hidrofóbicos (Manolaridis *et al.*, 2018). En el lado extracelular se encuentra la segunda cavidad de unión al sustrato, formada principalmente por TMDs y EL3. Esta segunda cavidad es más pequeña y está formada por aminoácidos más hidrofílicos; tanto la cavidad 1 como la 2 están separadas por un tapón formado por los aminoácidos de leucina de ambos protómeros (L554-L554'). Estas leucinas también están implicadas en la unión al sustrato (Eckenstaler y Benndorf, 2020).

El EL3 mencionado previamente es una pieza fundamental del transportador, ya que además de ser exclusivo del transportador y de formar parte de la cavidad 2 de unión a sustratos extracelulares, posee tres residuos de cisteína que forman puentes disulfuros, uno intramolecular (C592-C608) que permite el plegamiento correcto de la proteína en el proceso de síntesis y otro intermolecular (C603-C603') que une los protómeros del homodímero (Henriksen *et al.*, 2005; Wakabayashi-Nakao *et al.*, 2009). Posee también un residuo, el N596, el cual es un sitio de glicosilación al cual se une una N- acetilglicosamina, pieza clave en la maduración de la proteína en su paso por el aparato de Golgi. Las cisteínas y la asparagina de EL3 son puntos de control de la biosíntesis de BCRP, por lo tanto, puntos de vital importancia en la funcionalidad de la proteína (Nakagawa *et al.*, 2009).

De importancia son también los segmentos que unen los NBD y los TMD; estos segmentos también llamados *linkers* están constituidos por 2 helices α (helice α conectora y helice α de acoplamiento de TMD), tienen una longitud de 300 a 372 aminoácidos y son los encargados de transmitir los cambios conformacionales originados por la unión de ATP a los NBD (Manolaridis *et al.*, 2018).

4.1.2.3. Mecanismo de acción, sustratos e inhibidores del transportador BCRP

El mecanismo de acción más apoyado es el de Manolaridis *et al* (2018) representado en la Fig 6. Este mecanismo propone que el transportador ABCG2 tiene dos estados conformacionales; el primero, estado libre de nucleótido o *inward facing conformation* (IFC) en el cual, BCRP se dirige hacia el citosol con la cavidad 1 abierta y la 2 cerrada; y el segundo, estado de unión a ATP o *outward facing conformation* (OFC).

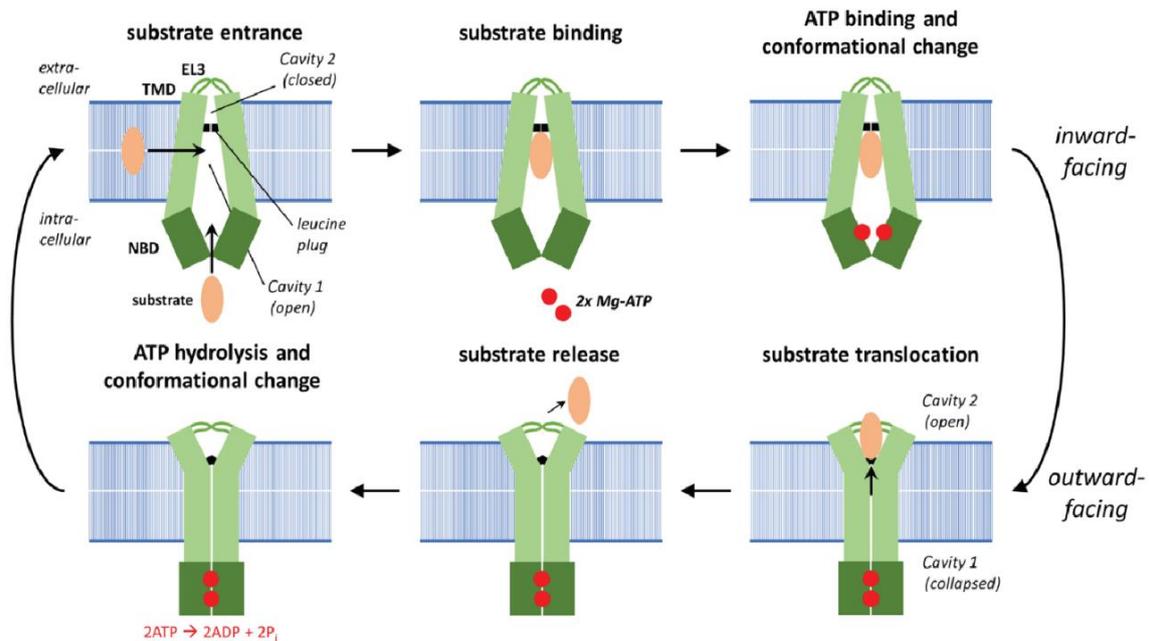


Fig 6. Ilustración del mecanismo de acción del transportador ABCG2 en presencia de un sustrato, en el que se muestran los cambios conformacionales ocasionados por la unión de ATP, así como el movimiento del sustrato desde que se une a la cavidad 1 del transportador desde el lado citosólico hasta su extrusión al medio extracelular (Eckenstaler y Benndorf, 2020).

En primer lugar, ocurre la unión de un sustrato a la cavidad 1. En esta cavidad el aminoácido R482 es de vital importancia y media en el reconocimiento del sustrato por el sitio de unión junto a F439 y N436 (Sarkadi *et al.*, 2020).

Posteriormente, tiene lugar la unión de ATP a los NBD, específicamente se une a aminoácidos del *Q loop* y Walker B debido a la ausencia de *Loop A*, el cual es el encargado de la unión al ATP en el resto de transportadores ABC. Manolaridis *et al* (2018) detalla que la unión a dos moléculas de ATP, una en cada NBD, induce la dimerización y junto a ella el cambio de la conformación del transportador de IFC a OFC. El hecho de que se junten los NBD hace que la cavidad 1 se cierre y el sustrato sea transportado hacia la cavidad 2 del EL3. La hidrólisis del ATP ocurre mediante un ataque nucleofílico de γ fosfato gracias a la ayuda de Walker B, *H loop*, *D loop* y *Q loop* (Locher, 2016).

Por último, la hidrólisis del ATP induce el cambio conformacional que es transmitido por los *linkers* hacia los TMDs, proporcionando la energía necesaria para la translocación del sustrato hasta el medio extracelular; de esta forma, se recupera la IFC y se liberan 2 ADP + Pi (Manolaridis *et al.*, 2018).

Es sabido que el transportador BCRP puede transportar una amplia variedad de sustratos, y se ha teorizado que un sustrato que entre en la cavidad 1 no tiene la obligación de interactuar con todos los residuos de la cavidad 1, sino que esta interacción variará dependiendo del tipo de sustrato; sin embargo, sí que es necesario que cada sustrato que sea transportado deba interactuar con el residuo R486 (Clark *et al.*, 2006).

Debido a la plasticidad de la cavidad 1 de las TMDs del transportador, este puede movilizar: fármacos anticancerígenos, sulfatos y glucurónicos conjugados del esteroide, endotoxinas, xenobióticos, marcadores fluorescentes, carcinógenos, aniones orgánicos conjugados, compuestos endógenos como la estrona-3-sulfato, nucleósidos monofosfato entre muchos otros.

Ya en el año 2014 se conocían alrededor de 200 sustratos y aunque la mayoría se solapan con los transportados por P-gp y MRP1, BCRP tiene una serie de sustratos e inhibidores característicos presentados en la tabla a continuación (Mao y Unadkat 2015; Liu, 2019).

Tabla 2. Principales sustratos e inhibidores respectivamente del transportador BCRP (Mao y Unadkat 2015; Liu, 2019).

Antracenos	Mitoxantrona, bisantreno
Derivados de camptotecina	Topotecan, SN-38, Irinotecan, diflomotecan
Poliglutamatos	Metotrexatos
Análogos de nucleósidos	Zidovudina, lamivudina, zidovudina 5' monofosfato
Fotosensibilizantes	Feoforbida a, protoporfirina IX, hematoporfirina
Inhibidores de tirosina-quinasa	Gefitinib, imatinib, nilotinib, erlotinib, afatinib, lapatinib
Otros fármacos	Nitrofurantoina, flavopiridol, etc
Inhibidores de tirosina-quinasa	Gefitinib, imatinib, erlotinib, afatinib, nilotinib etc
Inhibidores de proteasas de VIH	Ritanovir, saquinavir, nelfinavir, lopinavir
Inhibidores de proteasas de VCH	Boceprevir, telaprevir
Bloqueadores de canales de calcio	Nicardipina, nimodipina, nitrendipina
Antifúngicos Azoles	Itraconazole, ketaconazole, fluoconazole
Inmunosupresores	Ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus
Otros fármacos	Novobicina, tamoxifen, omeprazol etc

4.1.2.4. Expresión del transportador BCRP en cáncer

BCRP se expresa en una gran variedad de cánceres. Diversos estudios han correlacionado su sobreexpresión con el desarrollo de MDR y con la respuesta atenuada de pacientes a tratamientos con fármacos anticancerígenos. BCRP se ha visto implicado en leucemias como: leucemia mieloide aguda (Ross *et al.*, 2000), leucemia linfoblástica aguda (Plasschaert *et al.*, 2003), leucemias mieloides crónicas (Jordanides *et al.*, 2006) y en tumores sólidos como: carcinomas del tracto gastrointestinal, carcinomas de hígado, carcinomas vesiculares, carcinomas colorrectales, carcinomas pulmonares, carcinomas de mama, adenocarcinomas pancreáticos y en diversos melanomas (Lee *et al.*, 2012). También se ha encontrado en células madre de cáncer, las cuales tienen un papel importante en la tumorigénesis, heterogeneidad tumoral, MDR y metástasis (Wang *et al.*, 2014a).

4.1.2.5. Polimorfismos genéticos del transportador BCRP

Las variantes genéticas son factores de impacto en el comportamiento individual del paciente ante un determinado fármaco. Es por ello que diversos estudios farmacogenéticos se han llevado a cabo con el objetivo de descubrir cuál es la diversidad del gen *ABCG2* en las poblaciones humanas, así como cuáles son las implicaciones de esta diversidad en el efecto de diversos fármacos anticancerígenos.

Paralelamente a los estudios farmacogenéticos, estudios cristalográficos sobre la estructura química, como del funcionamiento del transportador BCRP han encontrado que ciertas mutaciones pueden deteriorar la función del transportador.

El gen *ABCG2* es altamente polimórfico y actualmente se conocen más de 100 SNPs; los de mayor interés, debido a que sus frecuencias en humanos son elevadas y por su implicación en el correcto funcionamiento del transportador son: C421A (Q141K) y G34A (V12M). Ambos tienen una frecuencia variable pero siempre por encima del 10%, siendo mayor en poblaciones del este de Asia. Se encuentran en los NBD del transportador, y son mutaciones sin sentido que dan lugar a la reducción de la expresión de BCRP en membrana (Chen *et al.*, 2019).

Específicamente la expresión de Q141K junto a SNPs de menor frecuencia son capaces de reducir la presencia de transportadores en membrana de eritrocitos entre un 30-50%, llevando a los individuos que presenten estos SNPs a desarrollar un fenotipo característico

llamado Jr-. Estos individuos a pesar de estar sanos tienen una respuesta dispar ante diferentes fármacos (Zelinski *et al.*, 2012).

Se ha establecido que la presencia de alelos recesivos A en individuos que llevan uno u otro de los SNPs nombrados, está relacionada con una mejor respuesta a tratamientos quimioterapéuticos, debido a la disminución de eflujo de fármacos por ausencia de transportadores y, por lo tanto, una mayor acumulación intracelular (Chen *et al.*, 2019).

Otro SNP de elevada importancia es uno de los residuos ubicados en la cavidad 1 de los TMDs y por lo tanto implicado en la especificidad de unión a ciertos sustratos. Este residuo es el R482. Se ha encontrado que el SNP R482G altera la dinámica de interacción de la TM 3 con las hélices vecinas, llegando a bloquear en cierta medida el transporte de sustratos a través de BCRP (László *et al.*, 2016).

También, N596 es importante, y puede ser diana terapéutica. Este residuo ubicado en EL3, es el punto de glicosilación de la proteína. Su disrupción por acción farmacológica o por mutación (N596G) lleva al mal plegamiento de la proteína y por lo tanto a la ubiquitinación y degradación a través de la vía proteosómica. Si de alguna forma, esta evita la vía degradativa, puede presentarse en elevada densidad en la membrana contribuyendo a la ausencia de eflujo desde el citosol y por ende a desarrollar un fenotipo con BCRP disfuncional (Nakagawa *et al.*, 2009).

Existen muchos más polimorfismos, sin embargo, los que mayor interés clínico despiertan por el momento son los nombrados.

4.1.2.6. Transportador BCRP y quimioterapia

Desde que se descubrió el transportador BCRP, poco a poco, según aumentaba el conocimiento del transportador este ha ido tomando una relevancia más central en el fenómeno de MDR en cáncer. Hoy en día el BCRP es conocido como un marcador de la diagnosis y prognosis en diversas neoplasias, debido a sus distintas características e implicación en la maduración del fenotipo de diversos cánceres. El fenotipo como ya se ha comentado previamente, está definido por múltiples factores, y difiere mucho entre distintos pacientes. Es por ello que la aproximación al problema mediante el uso de protocolos de quimioterapia convencional y generalista resulta inefectiva en múltiples casos, incluso llega a empeorar el problema originando fenotipos multirresistentes más agresivos.

Estos inconvenientes han presionado a la comunidad científica a buscar nuevas aproximaciones para erradicar o al menos evitar el desarrollo de MDR. Aunque pocas de estas aproximaciones han mostrado resultados esperanzadores en estudios *in vivo*, bien debido a la toxicidad, o a características farmacocinéticas del fármaco, los inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) se han postulado como candidatos esperanzadores debido a su alta biodisponibilidad, elevada distribución tisular, y mínimos efectos tóxicos (An y Morris, 2020).

4.2. Proteínas tirosina quinasa e inhibidores de tirosina quinasa

Los TKIs son moléculas que tienen por diana localizaciones específicas de la estructura de las PTKs (Proteínas tirosina quinasa). Están catalogados en dos tipos; siendo los smTKI (TKI de bajo peso molecular) los que más énfasis tienen en esta revisión; estas moléculas tienen la capacidad de inhibir la actividad de las PTKs (Herbrink *et al.*, 2015).

Las PTKs son de vital importancia, ya que están encargadas de una gran variedad de procesos fisiológicos como bioquímicos. Su desregulación está implicada en la proliferación celular que causa procesos tumorigénicos (Drake *et al.*, 2014), metástasis, angiogénesis, invasión tumoral y MDR (Knösel *et al.*, 2014). Se encuentran en la mayoría de los animales multicelulares y se dividen en dos categorías; receptores PTK (RTK) y no receptores PTK (nRTK). A su vez los RTK están divididos en: receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGR), receptor del factor de crecimiento endotelial (VEGFR) y receptor de insulina (IR) entre otros. (Jiao *et al.*, 2018).

Específicamente, la familia EGF (Factor de crecimiento epidérmico) de los receptores RTKs, está implicada en el crecimiento y desarrollo de diferentes órganos y tejidos; la familia está constituida por EGFR ((ErbB1) (oncogén homólogo viral de leucemia eritroblástica)), HER2 ((Receptor epidérmico humano) (ErbB2)), HER3(ErbB3), HER4(ErbB4). Todos ellos relacionados de una u otra manera con el desarrollo de cáncer y MDR. Sin embargo, los de mayor importancia son EGFR y HER2, presentes en la membrana celular regulando la supervivencia y apoptosis de las células epiteliales en cáncer de mama, de pulmón, de vejiga, de próstata y diversos carcinomas (Park *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015).

EGFR está constituido por varios segmentos; un segmento extracelular que actúa como sitio de unión al ligando EGF, un segmento intermembrana y uno intracelular con el dominio proteína quinasa (Roskoski, 2018).

El dominio con actividad tirosina quinasa es el encargado de transferir un grupo fosfato desde una molécula de ATP hasta una tirosina de otra proteína diana que produce una cascada de fosforilaciones que sirven como señales para regular diversos mecanismos (Roskoski, 2018). La estructura del dominio está compuesta de dos lóbulos: un lóbulo pequeño N- terminal y otro mayor C- terminal; los N terminales son ricos en glicina y forman una zona de unión al ATP. Es allí donde actúa el mecanismo de acción de los TKIs, los cuales mediante inhibición competitiva pelean por el sitio de unión del ATP. La unión satisfactoria del TKI evita que se den las reacciones en cascada que produce el receptor fosforilado (Wang *et al.*, 2014b; Roskoski, 2018; Jiao *et al.*, 2018).

4.3. Afatinib

Afatinib es un compuesto derivado de la quinazolina diseñado por Boehringer Ingelheim que actúa como un inhibidor irreversible de segunda generación de todos los dímeros formados por los miembros de la familia de receptores de las tirosina quinasa ErbB, HER2, HER3, EGF y HER4, inhibiendo su actividad, *in vivo* e *in vitro* (Li *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2018; Roskoski, 2018). Afatinib tiene elevada selectividad, alta eficacia y efectos secundarios mínimos y en el año 2013 fue aprobado por la FDA estadounidense (*Food and Drug Administration*) como fármaco de primera línea en el tratamiento en pacientes con mutación en el exón 21 (L858R) y delección del exón 19 (T790M) del gen *EGFR* en NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), los cuales desarrollan un fenotipo resistente por aumento de sensibilidad del receptor por el ATP ante diversos TKIs. Afatinib por lo tanto está diseñado para sustituir a gefitinib y erlotinib, TKIs de primera generación en el tratamiento del cáncer de pulmón, ya que estos, aunque son efectivos, llegan a desarrollar resistencia ante TKIs en pacientes con la mutación del gen *EGFR* incluida la variante con doble mutación L858R/T790M (Li *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2008; Bordi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

Además de NSCLC, afatinib también se ha mostrado efectivo en estudios *in vivo* contra células madre de cáncer fenotipo SP (*Side population*) (Wang *et al.*, 2014a), cáncer de mama metastásico positivo para HER2 (Zhang y Munster, 2014) y carcinomas metastásicos de células escamosas de cuello y cabeza (van Hoppe *et al.*, 2017). A pesar de estos datos, afatinib en estudios clínicos ha demostrado tener una distribución y biodisponibilidad limitada especialmente en tejidos o tumores que se encuentran alejados. Debido a esta razón se administra oralmente en altas dosis dando lugar a efectos secundarios no deseados (Hebrink *et al.*, 2015).

En cuanto a su perfil PK, afatinib sufre un metabolismo mínimo y es eliminado en un 85% a través de heces y el resto lo hace por vía renal (Tan *et al.*, 2019). Interacciona con los alimentos, especialmente los grasos, los cuales disminuyen su biodisponibilidad y no interactúa con el citocromo P450, como lo hacen otros agentes quimioterapéuticos (Stopfer *et al.*, 2012).

4.3.1. Mecanismo de acción de afatinib en la interacción con los receptores de crecimiento epidérmico

La interacción entre afatinib y los miembros de la familia ErbB se hace mediante un enlace covalente del grupo carbonilo insaturado de la molécula, el cual sufre un ataque nucleofílico por parte de un SH de la Cys 797 del sitio de unión a ATP del receptor. Junto al enlace covalente, una serie de enlaces no covalentes ayudan a que el afatinib se coloque en la posición adecuada del sitio de unión de ATP del receptor bloqueando la unión del ATP (Roskoski, 2018). De esta forma evita que EGF, al formalizar su unión desencadene cascadas de señalización a través de las siguientes rutas: proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) / quinasa regulada por señales extracelulares (ERK); fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) / Protein-quinasa B (AKT), (Crawford *et al.*, 2018) y Fosfolipasa C γ (PLC γ) / Protein-quinasa C (PKC) (Annenkov *et al.*, 2014). En último lugar el bloqueo de la actividad quinasa inhibirá la progresión tumoral, la supervivencia celular e inducirá la regresión tumoral (Jiao *et al.*, 2018).

4.3.2. Interacciones entre el transportador BCRP y Afatinib

Se ha demostrado que afatinib interactúa con el transportador BCRP, jugando un papel dual de interacción directa con BCRP, un papel regulador de la expresión de BCRP y un papel indirecto a través de la inhibición de las cascadas de fosforilación de la familia de EGFR (Fig 7).

4.3.2.1. Afatinib, regulador indirecto de la expresión de BCRP

La cascada de fosforilación de las quinasas activadas por los RTK modula la regulación de la expresión de los transportadores ABC, entre ellos BCRP. Esta cuestión está respaldada con el hecho de que el aumento de la expresión y de la función de los receptores está relacionada con un aumento en la MDR tanto ante TKIs como ante fármacos cuyas dianas distan del mero receptor (Crawford *et al.*, 2018).

Diversos ensayos reconocen que las cascadas de señalización de EGFR regulan directamente BCRP. El tratamiento en células madre de cáncer con inhibidores de PI3K disminuye la expresión del transportador en membrana, aumenta el almacenamiento citosólico,

pero mantiene los niveles de expresión celular, por lo tanto, altera el tráfico del transportador (Mogi *et al.*, 2003).

En contraposición a la inhibición, la expresión constitutiva del receptor de EGF se correlaciona con el aumento de mRNA de BCRP en diversos tejidos. Diversos autores afirman que la actividad del receptor modula la señalización, transcripción, estabilidad y fijación del transportador en la membrana (Crawford *et al.*, 2018). Esto es así, ya que en estudios en los que se daba la activación de la ruta AKT permitían la acumulación y expresión de BCRP (Takada *et al.*, 2012). La activación de AKT está relacionada con la unión al promotor del protooncogen serina/treonina quinasa pim-1 que sintetiza Pim-1, el cual se une al residuo T362 de la región *linker* del transportador BCRP y modula el transporte, fijación, localización y expresión de BCRP (Darby *et al.*, 2015; Crawford *et al.*, 2018).

El uso de afatinib como inhibidor irreversible de la familia de los EGFR evita la actividad quinasa del receptor bloqueando todos estos mecanismos moleculares y consecuentemente lleva a superar el fenotipo resistente del cáncer por sobreexpresión de BCRP (Fig 7 A).

4.3.2.2. Afatinib, regulador directo de la expresión y actividad de BCRP

Afatinib es capaz de interactuar directamente con ABCG2 *wild-type* como sustrato, ya que los cánceres que tienen una elevada expresión de ABCG2 expulsan afatinib disminuyendo su actividad (Inove *et al.*, 2019) y también como modulador de la expresión del gen ABCG2 (Wang *et al.*, 2014a).

Hoppe *et al* en el año 2014 realizó una serie de ensayos para conocer el efecto del transportador BCRP en la disposición de afatinib en el cerebro a través de la barrera hematoencefálica. El resultado fue que inequívocamente BCRP era capaz de transportar afatinib. Además, le permitió concluir que todos los tejidos donde se sobreexpresa BCRP median en la modulación de su PK. Como ejemplo tenemos el epitelio intestinal, el cual disminuye la absorción de afatinib y el hígado que aumenta la excreción hepática del fármaco. Este efecto es aditivo, ya que también se concluyó que P-gp transportaba afatinib y la acción conjunta de los dos transportadores convertía en mínima su disposición en el cerebro.

A pesar de que aún no está claro como interactúa el transportador BCRP para mediar su transporte de afatinib a nivel bioquímico, sí que se conoce que afatinib es capaz de unirse selectivamente a los sitios de unión de ATP de cada uno de los NBDs del transportador

inhibiendo su actividad y la unión del ATP, por otro lado, imposibilitando la transmisión del cambio conformacional de la estructura para dar lugar a la extrusión de los sustratos (Fig 7 B) (Wang *et al.*, 2014b).

Otro estudio relevante, llevado a cabo por Wang *et al* (2014a) en células madre de cáncer con fenotipo SP, células caracterizadas por sobreexpresar BCRP, concluyó que afatinib provocaba la disminución de los niveles de células madre de cáncer SP, sobre todo de células madre primarias de leucemia, por disminución de la expresión de BCRP. Así mismo, se vio que aumenta la eficacia de agentes quimioterapéuticos administrados conjuntamente, reduce la propensión a formar agregados celulares y daña drásticamente la tumorigénesis, su crecimiento y renovación celular. Paralelamente Wang *et al* (2014a) realizó el mismo estudio en otras líneas celulares; en carcinoma de colon, en células de cáncer de mama que sobreexpresa el transportador (MCF7) y en carcinoma nasofaríngeo y el resultado fue el mismo.

El efecto dual de afatinib concluye con su actividad como silenciador génico. Así, afatinib es capaz de incrementar la síntesis de metilasa de DNA, las cuales metilan las islas funcionales CpG ubicadas en el promotor del gen llegando a suprimir la expresión del transportador BCRP (Fig 7 C) (Wang *et al.*, 2014a).

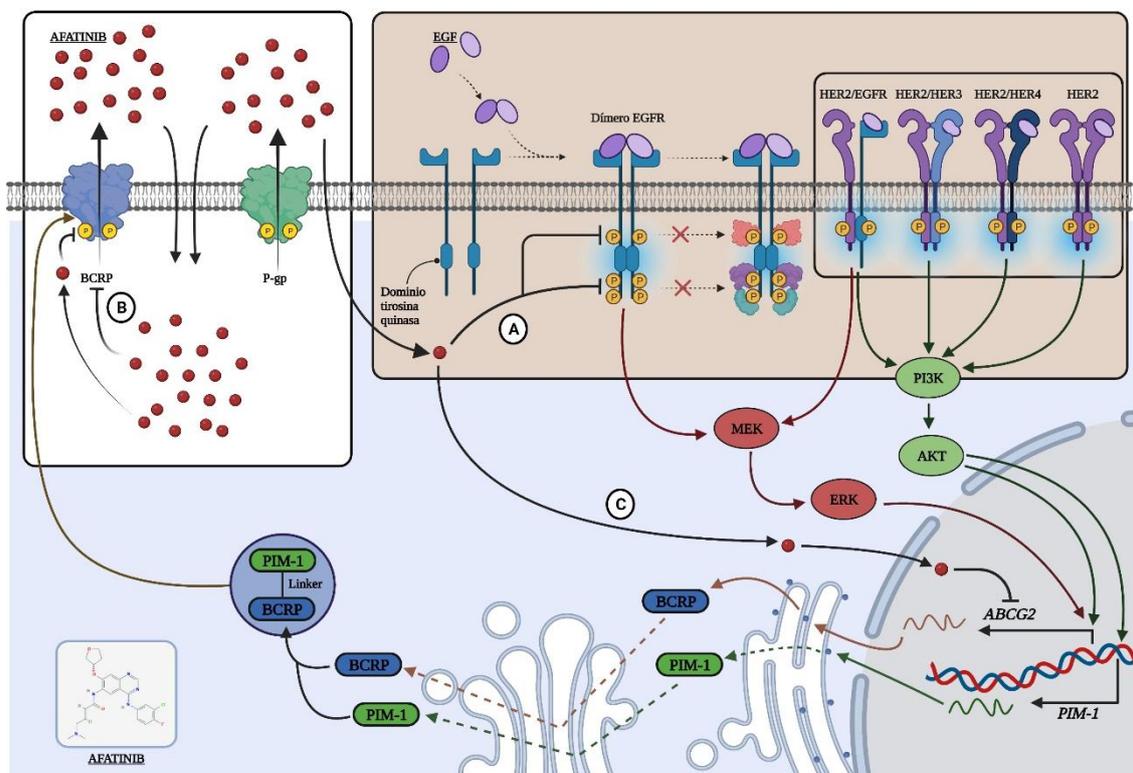


Fig 7. Ilustración de las vías de interacción entre afatinib y el transportador BCRP. 7 A) afatinib como regulador indirecto de BCRP. 7 B) afatinib como inhibidor de la actividad de BCRP. 7 C) afatinib como inhibidor de la expresión de BCRP.

4.3.2.3. Perspectivas y retos de afatinib

Afatinib es seguro, es potente y específico y administrado junto a otros fármacos convencionales como topotecan (Wang *et al.*, 2014b), SN38 (Inove *et al.*, 2019), rapamicina (Li *et al.*, 2008) e inhibidores de P-gp es capaz de evitar MDR con buenos resultados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, pudiendo incluso llegar al cerebro siempre y cuando el protocolo del tratamiento sea adecuado.

El futuro de afatinib pasa por un estudio más exhaustivo de su interacción con BCRP y otros transportadores. El especial interés recae en estudios cristalográficos de la interacción entre ambos. Sería también interesante comprender mejor cuál es el papel de los distintos polimorfismos en los distintos aspectos de afatinib, ya que aún no hay consenso en los estudios farmacogenéticos realizados con los SNPs C421(Q141K) y G34A (V12M). Hayashi *et al.*, (2019) afirma que en los pacientes con el alelo A (C421A) se observa un incremento de los niveles de afatinib en plasma. Inove *et al.*, (2019), Tan *et al.*, (2019) y Sogawa *et al.*, (2020) en contraposición ofrecen resultados opuestos a Hayashi *et al.* y afirman que no hay asociación entre este polimorfismo y los niveles de afatinib en plasma. Tan *et al.*, además recoge el SNP G34A en su estudio, dando los mismos resultados que en C421A.

Así mismo, sería interesante conocer como interactúan los nuevos y antiguos fármacos anticancerígenos con afatinib en diversas líneas celulares de cáncer.

5. CONCLUSIONES

1. El transportador BCRP es uno de los que mayor peso tienen en el desarrollo de MDR. Se encuentra dispuesto en una gran variedad de tejidos, principalmente en aquellos que forman parte de barreras fisiológicas y juegan un papel en la distribución, absorción y transporte de una gran variedad de sustratos, entre ellos, diversos compuestos anticancerígenos. Su sobreexpresión contribuye al desarrollo de un fenotipo multirresistente y más agresivo de cáncer que trae consigo una peor prognosis, menor tasa de supervivencia y por ende un número más elevado de muertes al año.

2. El gen que codifica a BCRP es altamente polimórfico y existen muchos SNPs con diferentes frecuencias según el grupo étnico, pero destacan Q141K y V12M debido a su alta frecuencia en humanos. Ambos son responsables de un fenotipo con mejor respuesta ante fármacos.

3. Con respecto a Afatinib, es un fármaco potente, específico y que es capaz de evitar el desarrollo de MDR e inducir regresión tumoral en diversos tipos de cáncer. Es inhibidor de diversos receptores con actividad tirosina quinasa, siendo su diana principal los miembros de la familia ErbB. Actúa bloqueando la unión de ATP al dominio quinasa y su uso está aprobado por la FDA en cáncer de pulmón cuyos pacientes presentan mutaciones en EGFR que los vuelve resistentes a TKIs de primera generación.

4. Está demostrado que afatinib interactúa con el transportador BCRP como sustrato e inhibidor. Actúa como inhibidor de la expresión, transporte, localización, fijación y actividad del transportador BCRP mediante la inhibición del receptor de tirosina quinasa o bien por la interacción directa e indirecta con BCRP. Así disminuye su expresión por aumento de la actividad metilasa en las islas CpG del promotor del gen. También disminuye su actividad por unión a los sitios de unión a ATP en los NBDs del transportador.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alaoui-Jamali, M. A., Dupré, I. y Qiang, H. (2004) "Prediction of drug sensitivity and drug resistance in cancer by transcriptional and proteomic profiling", *Drug resistance updates*, 7(4–5), pp. 245–255.

Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E. y Rauch, C. (2015) "Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp", *Cancer cell international*, 15(1), pp. 1–13.

An, G. y Morris, M. E. (2020) "Efflux transporters in cancer resistance: Molecular and functional characterization of breast cancer resistance protein", en *Drug efflux pumps in cancer resistance pathways: From molecular recognition and characterization to possible inhibition strategies in chemotherapy*, pp. 67–96.

Annenkov, A. (2014) "Receptor tyrosine kinase (RTK) signalling in the control of neural stem and progenitor cell (NSPC) development", *Molecular neurobiology*, 49(1), pp. 440–471.

Araos, J., Sleeman, J. P. y Garvalov, B. K. (2018) "The role of hypoxic signalling in metastasis: towards translating knowledge of basic biology into novel anti-tumour strategies", *Clinical and experimental metastasis*, (35)7, pp. 563-599.

Aronica, E., Gorter, J. A., Redeker, S., van Vliet, E. A., Ramkema, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van der Valk, P., Leenstra, S., Baayen, J. C., Spliet, W. G. M. y Troost, D. (2005) "Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain.", *Epilepsia*, 46(6), pp. 849–857.

Assaraf, Y. G., Brozovic, A., Gonçalves, A. C., Jurkovicova, D., Linē, A., Machuqueiro, M., Saponara, S., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Xavier, C. P. R. y Vasconcelos, M. H. (2019) "The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer", *Drug resistance updates*, 46, p. 1-30. 1

Berger, E. A. y Heppel, L. A. (1974) "Different Mechanisms of Energy Coupling for the Shock sensitive and Shock resistant Amino Acid Permeases of Escherichia coli", *Journal of biological chemistry*, 249(24), pp. 7747–7755.

Bordi, P., Tiseo, M., Bortesi, B., Naldi, N., Buti, S. y Ardizzoni, A. (2014) "Overcoming T790M-driven acquired resistance to EGFR-TKIs in NSCLC with afatinib: A case report", *Tumori*, 100(1), pp. 20–23.

- Bunting, K. D. (2002) "ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells", *Stem cells*, 20(1), pp. 11–20.
- Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. y Swanton, C. (2013) "The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution", *Nature*, 501(7467), pp. 338–345.
- Chen, L., Manautou, J. E., Rasmussen, T. P. and Zhong, X. bo (2019) "Development of precision medicine approaches based on inter-individual variability of BCRP/ABCG2", *Acta pharmaceutica sinica b*, 9(4), pp. 659–674.
- Choi, Y. H. y Yu, A. M. (2014) "ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetic, and Strategies dor Drug Development", *Current pharmaceutical desing*, 20(5), pp. 793–807.
- Clark, R., Kerr, I. D. y Callaghan, R. (2006) "Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter", *British journal of pharmacology*, 149(5), pp. 506–515.
- Conlon, G. A. y Murray, G. I. (2019) "Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis", *The journal of pathology*, 247(5), pp. 629–640.
- Cooray, H. C., Blackmore, C. G., Maskell, L. y Barrand, M. A. (2002) "Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain", *Neuroreport*, 13(16), pp. 2059–2063.
- Crawford, R. R., Potukuchi, P. K., Schuetz, E. G. y Schuetz, J. D. (2018) "Beyond Competitive Inhibition: Regulation of ABC Transporters by Kinases and Protein-Protein Interactions as Potential Mechanisms of Drug-Drug Interactions", *Drug metabolism and disposition*, 46(5), pp. 567–580.
- Darby, R. A. J., Unsworth, A., Knapp, S., Kerr, I. D. y Callaghan, R. (2015) "Overcoming ABCG2-mediated drug resistance with imidazo-[1,2-b]-pyridazine-based Pim1 kinase inhibitors", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 76(4), pp. 853–864.
- Dean, M. (2005) "The genetics of ATP-binding cassette transporters", *Methods in enzymology*, 400(1972), pp. 409–429.
- Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huché, F., Di Pietro, A. y Falson, P. (2010) "ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop", *Journal of biological chemistry*, 285(43), pp. 33123–33133.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V, Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. y Ross, D. D. (1998) "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.", *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 95(26), pp. 15665–15670.
- Drake, J. M., Lee, J. K. y Witte, O. N. (2014) "Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer", *Molecular and cellular biology*, 34(10), pp. 1722–1732.
- Eckenstaler, R. y Benndorf, R. A. (2020) "3D structure of the transporter ABCG2-What's new?", *British journal of pharmacology*, 177(7), pp. 1485–1496.
- Fatima, S., Zhou, S. y Sorrentino, B. P. (2012) "Abcg2 expression marks tissue-specific stem cells in multiple organs in a mouse progeny tracking model", *Stem cells*, 30(2), pp. 210–221.
- Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D. y Haber, M. (2016) "ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology", *Drug resistance updates*, 26, pp. 1–9.
- Gong, J., Luk, F., Jaiswal, R., George, A. M., Grau, G. E. R. y Bebawy, M. (2013) "Microparticle drug sequestration provides a parallel pathway in the acquisition of cancer drug resistance", *European journal of pharmacology*, 721(1–3), pp. 116–125.
- Gottesman, M. M., Lavi, O., Hall, M. D. y Gillet, J. P. (2016) "Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance", *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56(20), pp.1-18.
- Green, D. R. y Llambi, F. (2015) "Cell death signaling", *Cold spring harbor laboratory press*, 7(12), pp. 1-24.
- Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C. y Drewe, J. (2005) "Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract", *Biochemical pharmacology*, 70(5), pp. 695–699.

- Han, Y. H., Abdul Hamid, M. R. W., Telisinghe, P. U., Haji Hussin, J. B. and Mabruk, M. (2015) "Overexpression of EGFR protein in Bruneian lung cancer patients", *Asian pacific journal of cancer prevention*, 16(1), pp. 233–
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011) "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*, 144(5), pp. 646–674.
- Hayashi, H., Iihara, H., Hirose, C., Fukuda, Y., Kitahora, M., Kaito, D., Yanase, K., Endo, J., Ohno, Y., Suzuki, A. y Sugiyama, T. (2019a) "Effects of pharmacokinetics-related genetic polymorphisms on the side effect profile of afatinib in patients with non-small cell lung cancer", *Lung cancer*, 134, pp. 1–6.
- Henriksen, U., Fog, J. U., Litman, T. y Gether, U. (2005) "Identification of Intra and Intermolecular Disulfide Bridges in the Multidrug Resistance Transporter ABCG2", *Journal of biological chemistry*, 280(44), pp. 36926–36934.
- Herbrink, M., Nuijen, B., Schellens, J. H. M. y Beijnen, J. H. (2015) "Variability in bioavailability of small molecular tyrosine kinase inhibitors", *Cancer treatment reviews*, 41(5), pp. 412–422.
- van Hoppe, S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2017) "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-gp/ABCB1) transport afatinib and restrict its oral availability and brain accumulation", *Pharmacological research*, 120, pp. 43–50.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. y Sarkar, S. (2014) "Drug resistance in cancer: An overview", *Cancers*, 6(3), pp. 1769–1792.
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S. y Brenner, C. (2011) "Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells", *Biochimica et biophysica acta - bioenergetics*, 1807(6), pp. 735–745.
- Inoue, Y., Morita, T., Onozuka, M., Saito, K., Sano, K., Hanada, K., Kondo, M., Nakamura, Y., Kishino, T., Nakagawa, H. y Ikegami, Y. (2019) "Impact of Q141K on the transport of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors by ABCG2", *Cells*, 8(763), pp. 1–12.
- Ji, K., Mayernik, L., Moin, K. y Sloane, B. F. (2019) "Acidosis and proteolysis in the tumor microenvironment", *Cancer and metastasis reviews*, 38(1–2), pp. 103–112.
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q. y Wang, Y. shan (2018) "Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance", *Molecular cancer*, 17(1), pp. 1–12.
- Jordanides, N. E., Jorgensen, H. G., Holyoake, T. L. y Mountford, J. C. (2006) "Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate", *Blood*, 108(4), pp. 1370–1373.
- Knösel, T., Kampmann, E., Kirchner, T. y Altendorf-Hofmann, A. (2014) "[Tyrosine kinases in soft tissue tumors]", *Der pathologe*, 35(2), pp. 198–201.
- Kolata, G. (1986) "Why Do Cancer Cells Resist Drugs?", *Science*, 231, pp. 220–221.
- Krishna, R. y Mayer, L. D. (2000) "Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs", *European journal of pharmaceutical sciences*, 11(4), pp. 265–283.
- László, L., Sarkadi, B. y Hegedűs, T. (2016) "Jump into a New Fold-A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter", *Plos one*, 11(10), p. e0164426.
- Lee, C. A., O'connor, M. A., Ritchie, T. K., Galetin, A., Cook, J. A., Ragueneau-Majlessi, I., Ellens, H., Feng, B., Taub, M. E., Paine, M. F., Polli, J. W., Ware, J. A. y Zamek-Gliszczyński, M. J. (2015) "Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: Practical recommendations for clinical victim and perpetrator Drug-Drug interaction study design", *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 43(4), pp. 490-509.
- Lee, S. H., Kim, H., Hwang, J.-H., Lee, H. S., Cho, J. Y., Yoon, Y.-S. y Han, H.-S. (2012) "Breast cancer resistance protein expression is associated with early recurrence and decreased survival in resectable pancreatic cancer patients", *Pathology international*, 62(3), pp. 167-175.
- Li, D., Ambrogio, L., Shimamura, T., Kubo, S., Takahashi, M., Chirieac, L. R., Padera, R. F., Shapiro, G. I., Baum, A., Himmelsbach, F., Rettig, W. J., Meyerson, M., Solca, F., Greulich, H. y Wong, K. K. (2008) "BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models", *Oncogene*, 27(34), pp. 4702-4711.

- Litman, T., Jensen, U., Hansen, A., Covitz, K. M., Zhan, Z., Fetsch, P., Abati, A., Hansen, P. R., Horn, T., Skovsgaard, T. y Bates, S. E. (2002) "Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2", *Biochimica et biophysica acta biomembranes*, 1565(1), pp. 6–16.
- Liu, X. (2019) "ABC Family Transporters", in *Drug transporters in drug disposition, effects and toxicity, advances in experimental medicine and biology*, pp. 13–100.
- Locher, K. P. (2016) "Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters", *Nature structural and molecular biology*, 23(6), pp. 487–493.
- Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., Kowal, J., Stahlberg, H. y Locher, K. P. (2018) "Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states", *Nature*, 563(7731), pp. 426–430.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. y Baradaran, B. (2017) "The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review", *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(3), pp. 339–348.
- Mao, Q. y Unadkat, J. D. (2005) "Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport.", *The AAPS journal*, 7(1), pp. E118-33.
- Mao, Q. y Unadkat, J. D. (2015) "Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport-an Update", *AAPS journal*, 17(1), pp. 65–82.
- Merino, G., Alvarez, A. I., Pulido, M. M., Molina, A. J., Schinkel, A. H. y Prieto, J. G. (2006) "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion", *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34(4), pp. 690–695.
- Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., van Herwaarden, A. E. y Schinkel, A. H. (2005) "The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin", *Molecular pharmacology*, 67(5), pp. 1758–1764.
- Mo, W. y Zhang, J.-T. (2012) "Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance", *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(1), pp. 1–27.
- Mogi, M., Yang, J., Lambert, J.-F., Colvin, G. A., Shiojima, I., Skurk, C., Summer, R., Fine, A., Quesenberry, P. J. y Walsh, K. (2003) "Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation.", *The journal of biological chemistry*, 278(40), pp. 39068–39075.
- Mukerjee, G., Huston, A., Kabakchiev, B., Piquette-Miller, M., van Schaik, R. y Dorfman, R. (2018) "User considerations in assessing pharmacogenomic tests and their clinical support tools", *Genomic medicine*, 3(1), pp. 1–9.
- Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshiha, S. y Ishikawa, T. (2009) "Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2", *The FEBS journal*, 276(24), pp. 7237–7252.
- Namee, N. M. y O'Driscoll, L. (2018) "Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance", *Biochimica et biophysica acta reviews on cancer*, 1870(2), pp. 123–136.
- Organización mundial de la salud (2021) *Agencia internacional de investigación del cáncer [ECIS-European cancer information system]*. Disponible en: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/> (Accedido: 22 de 05 de 2021).
- Park, H. S., Jang, M. H., Kim, E. J., Kim, H. J., Lee, H. J., Kim, Y. J., Kim, J. H., Kang, E., Kim, S.-W., Kim, I. A. y Park, S. Y. (2014) "High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer", *Modern pathology : an official journal of the united states and canadian academy of pathology*, 27(9), pp. 1212–1222.
- Peetla, C., Vijayaraghavalu, S. y Labhasetwar, V. (2013) "Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles", *Advanced drug delivery reviews*, 65(13–14), pp.
- Plasschaert, S. L. A., van der Kolk, D. M., de Bont, E. S. J. M., Kamps, W. A., Morisaki, K., Bates, S. E., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Vellenga, E. y de Vries, E. G. E. (2003) "The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia", *Clinical cancer research : an official journal of the american association for cancer research*, 9(14), pp. 5171–5177. A

- Polgar, O., Robey, R. W. and Bates, S. E. (2008) "ABCG2: structure, function and role in drug response", *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(1), pp. 1–15.
- Puram, S. V, Tirosh, I., Parikh, A. S., Patel, A. P., Yizhaz, K., Gillespie, S. y et al (2018) "Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer", *Cell*, 123(24), pp. 4757–4763.
- Ramu, A., Pollard, Harvey B. y Rosario, L. M. (1989) "Doxorubicin resistance in P388 leukemia evidence for reduced drug influx", *International journal of cancer*, 44(3), pp. 539–547.
- Riechelmann, R. P., Tannock, I. F., Wang, L., Saad, E. D., Taback, N. A. y Krzyzanowska, M. K. (2007) "Potential drug interactions and duplicate prescriptions among cancer patients", *Journal of the national cancer institute*, 99(8), pp. 592–600.
- Roskoski-Jr, R. (2019) "Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers", *Pharmacological research*, 139, pp. 395–411. d
- Ross, D. D., Karp, J. E., Chen, T. T. y Doyle, L. A. (2000) "Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia", *Blood*, 96(1), pp. 365–368.
- Saghafinia, S., Mina, M., Riggi, N., Hanahan, D. y Ciriello, G. (2018) "Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors", *Cell reports*, 25(4), pp. 1066–1080.
- Sarkadi, B., Homolya, L. y Hegedűs, T. (2020) "The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology", *FEBS letters*, 594(23), pp. 4012–4034.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G. y Váradi, A. (2006) "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system", *Physiological reviews*, 86(4), pp. 1179–1236.
- Schinkel, A. y Jonker, J. (2012) "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview", *Advanced drug delivery reviews*, 64, pp. 138–153.
- Scripture, C. D. y Figg, W. D. (2006) "Drug interactions in cancer therapy", *Nature reviews cancer*, 6(7), pp. 546–558.
- Slot, A. J., Molinski, S. V y Cole, S. P. C. (2011) "Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs)", *Essays in biochemistry*, 50, pp. 179–207.
- Sogawa, R., Nakashima, C., Nakamura, T., Takeuchi, K., Kimura, Sakiko, Komiya, K., Narisawa, Y., Kimura, Shinya y Sueoka-Aragane, N. (2020) "Association of genetic polymorphisms with afatinib-induced diarrhoea", *In vivo*, 34(3), pp. 1415–1419.
- Stopfer, P., Marzin, K., Narjes, H., Gansser, D., Shahidi, M., Uttereuther-Fischer, M. y Ebner, T. (2012) "Afatinib pharmacokinetics and metabolism after oral administration to healthy male volunteers", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 69(4), pp. 1051–1061.
- Spitzwieser, M., Pirker, C., Koblmüller, B., Pfeiler, G., Hacker, S., Berger, W., Heffeter, P. y Cichna-Markl, M. (2016) "Promoter methylation patterns of ABCB1, ABCC1 and ABCG2 in human cancer cell lines, multidrug-resistant cell models and tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients", *Oncotarget*, 7(45), pp. 73347–73369.
- Takada, T., Suzuki, H., Gotoh, Y. y Sugiyama, Y. (2005) "Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of AKT in polarized cells", *Drug metabolism and disposition*, 33(7), pp. 905–909.
- Tan, Y., Cao, K., Ren, G., Qin, Z., Zhao, D., Li, N., Chen, X., Xia, Y. y Lu, Y. (2019) "Effects of the ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on the pharmacokinetics of afatinib in healthy Chinese volunteers", *Xenobiotica*, 50(2), pp. 237–243.
- Tarasov, V. V, Chubarev, V. N., Ashraf, G. M., Dostdar, S. A., Sokolov, A. V, Melnikova, Tatiana I Sologova, Susanna S Grigorevskich, Ekaterina M Makhmutova, Alfiya Kinzirsky, Alexander S Klochkov, S. G. y Aliev, G. (2019) "How Cancer Cells Resist Chemotherapy: Design and Development of Drugs Targeting Protein-Protein Interactions", *Current topics in medicinal chemistry*, 19(6), pp. 394–412.
- Turner, A. P., Alam, C. y Bendayan, R. (2020) "Efflux transporters in cancer resistance: Molecular and functional characterization of P-glycoprotein", in *Drug efflux pumps in cancer resistance pathways: from molecular*

recognition and characterization to possible inhibition strategies in chemotherapy, pp. 1–30.

Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Furukawa, T., Nakagawa, H. y Ishikawa, T. (2009) "Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation", *Advanced drug delivery reviews*, 61(1), pp. 66–72.

Wang, X. K., He, J. H., Xu, J. H., Ye, S., Wang, F., Zhang, H., Huang, Z. C., To, K. K. W. y Fu, L. W. (2014a) "Afatinib enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic agents by eradicating cancer stem-like cells", *Cancer research*, 74(16), pp. 4431–4445.

Wang, X. K., To, K. K. W., Huang, L. Y., Xu, J. H., Yang, K., Wang, F., Huang, Z. C., Ye, S. y Fu, L. W. (2014b) "Afatinib circumvents multidrug resistance via dually inhibiting ATP binding cassette subfamily G member 2 In vitro and in vivo", *Oncotarget*, 5(23), pp. 11971–11985.

Wang, Z. y Cole, P. A. (2016) "Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases", *Methods in enzymology*, 548, pp. 1–21.

Whitlock, B. D. y Leslie, E. M. (2020) "Efflux transporters in anti-cancer drug resistance: Molecular and functional identification and characterization of multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs), Drug Efflux Pumps" *en Cancer resistance pathways: from molecular recognition and characterization to possible inhibition strategies in chemotherapy*, pp. 31-65.

Wilting, R. H. y Dannenberg, J. H. (2012) "Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance", *Drug resistance updates*, 15(1–2), pp. 21–38.

Yun, C.-H., Mengwasser, K. E., Toms, A. V, Woo, M. S., Greulich, H., Wong, K.-K., Meyerson, M. and Eck, M. J. (2008) "The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), p. 2070-2075.

Zelinski, T., Coghlan, G., Liu, X.-Q. y Reid, M. E. (2012) "ABCG2 null alleles define the Jr (a-) blood group phenotype", *Nature genetics*, 44(2), pp. 131–132.

Zhang, X. y Munster, P. N. (2014) "New protein kinase inhibitors in breast cancer: Afatinib and neratinib", *Expert opinion on pharmacotherapy*, 15(9), pp. 1277–1288.

Zhitomirsky, B., Yunaev, A., Kreiserman, R., Kaplan, A., Stark, M. y Assaraf, Y. G. (2018) "Lysosomotropic drugs activate TFEB via lysosomal membrane fluidization and consequent inhibition of mTORC1 activity", *Cell death and disease*, 9(12), pp. 1-15.