

**TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO CONVENCIONAL EN  
RABDOMIOSARCOMA EMBRIONARIO. RESISTENCIA A DROGAS Y  
MODULACIÓN ANTIGÉNICA**

Memoria que presenta **D. Francisco Archilla Peña** para optar al Grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía.  
Granada, Diciembre de 2005



**Dr. Jose Carlos Prados Salazar**, TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, **“TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO CONVENCIONAL EN RABDOMIOSARCOMA EMBRIONARIO. RESISTENCIA A DROGAS Y MODULACIÓN ANTIGÉNICA”**, ha sido realizado bajo mi dirección por el licenciado **D. Francisco Archilla Peña** corresponde fielmente a los resultados obtenidos. Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 12 de Diciembre de 2005

**Dra. Antonia Aránega Jiménez**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, **“TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO CONVENCIONAL EN RABDOMIOSARCOMA EMBRIONARIO. RESISTENCIA A DROGAS Y MODULACIÓN ANTIGÉNICA”**, ha sido realizado bajo mi dirección por el licenciado **D. Francisco Archilla Peña** corresponde fielmente a los resultados obtenidos. Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 12 de Diciembre de 2005

**Dr. Lúis Álvarez Guisado**, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, **“TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO CONVENCIONAL EN RABDOMIOSARCOMA EMBRIONARIO. RESISTENCIA A DROGAS Y MODULACIÓN ANTIGÉNICA”**, ha sido realizado bajo mi dirección por el licenciado **D. Francisco Archilla Peña** corresponde fielmente a los resultados obtenidos. Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 12 de Diciembre de 2005

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	16
<b>1. RABDOMIOSARCOMAS</b> .....	18
1.1. RABDOMIOSARCOMA: UN TUMOR DE ORIGEN MIOGÉNICO.....	18
1.2. PRONÓSTICO DE LOS RABDOMIOSARCOMAS.....	19
1.3. RABDOMIOSARCOMAS: CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA .....	21
1.4. ESTADIOS EVOLUTIVOS DE LOS RABDOMIOSARCOMAS .....	22
1.5. RABDOMIOSARCOMAS: OPCIONES TERAPÉUTICAS.....	24
a. Tratamiento quirúrgico. ....	24
b. Tratamiento con quimioterapia.....	27
b.1. Tratamiento quimioterapéutico en RMS de bajo riesgo....	28
b.2. Tratamiento quimioterapéutico en RMS de riesgo intermedio.....	29
b.3. Tratamiento quimioterapéutico en RMS de alto riesgo....	30
b. 4. Modificaciones de los regímenes de quimioterapia.....	30
c. Tratamiento con radioterapia.....	31
1.6. RABDOMIOSARCOMA INFANTIL RECURRENTE .....	33
<b>2. CÉLULA MUSCULAR, ORIGEN DE LOS RABDOMIOSARCOMAS</b> .....	35
2.1. EL CITOESQUELETO DE LA CÉLULA MUSCULAR.....	35
2.2. LOS FILAMENTOS DELGADOS DEL SARCÓMERO .....	36
2.3. LOS FILAMENTOS GRUESOS DEL SARCÓMERO.....	37
2.4. EL PROCESO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	38
2.5. LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS .....	40
2.6. DIFERENCIACIÓN MUSCULAR. EL PROCESO DE LA MIOGÉNESIS.....	41
<b>3. RESISTENCIA A MULTIDROGAS, UNA LIMITACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LOS RABDOMIOSARCOMAS</b> .....	44
3.1. RESISTENCIA MEDIADA POR P- GLICOPROTEÍNA.....	45
3.2. ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA .....	46
3.3. GLICOSILACIÓN, FOSFORILACIÓN Y ACTIVIDAD ATPASA DE P-GLICOPROTEÍNA .....	47

## Índice

3.4. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE P-GLICOPROTEÍNA .....	50
3.5. EXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA EN CÁNCER .....	51
3.6. REVERSIÓN DE RESISTENCIA MEDIADA POR P-GLICOPROTEÍNA .....	54
<b>4. OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA A DROGAS EN CÁNCER..</b>	<b>60</b>
4.1. LAS PROTEINAS MRP Y LRP.....	60
4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA “NO CLÁSICA” .....	64
4.2.1. Glutation-S-transferasa como inductor de resistencia a drogas.....	65
4.2.2. Topoisomerasas como mecanismo de resistencia.....	66
4.2.3. Resistencia y fenómeno apoptótico.....	68
<b>5. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y CÁNCER.....</b>	<b>72</b>
5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MHC.....	72
5.2. INMUNOLOGÍA Y CÁNCER.....	75
5.2.1. Mecanismos de escape tumoral.....	75
5.2.2. Cáncer e inmunoterapia .....	77
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>81</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
<b>1. LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>87</b>
<b>2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>87</b>
<b>3. CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>87</b>
<b>4. INDUCCIÓN A LA RESISTENCIA DE CÉLULAS EN CULTIVO.....</b>	<b>88</b>
<b>5. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD FRENTE A ACTINOMICINA D.....</b>	<b>89</b>
<b>6. ESTUDIOS DE CROS-RESISTENCIA.....</b>	<b>89</b>
<b>7. DETERMINACIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA EN LÍNEAS DE RMS.....</b>	<b>90</b>
7.1. Obtención de sondas y marcaje.....	90
7.2. Extracción de ARN de las células RMS.....	91
7.3. Desnaturalización de ARN .....	92

## Índice

7.4. Electroforesis de ARN en gel desnaturizante .....	92
7.5. Northern blot o transferencia de ARN .....	93
7.6. Hibridación.....	93
<b>8. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS MHC EN CÉLULAS</b>	
<b>DE RMS. FACScan.....</b>	<b>94</b>
<b>9. BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS</b>	
<b>RMS MEDIANTE VERAPAMILO.....</b>	<b>95</b>
<b>10. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y</b>	
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....</b>	<b>96</b>
10.1. Fijación de las células .....	96
10.2. Inclusión de la muestra .....	97
10.3. Cortes ultrafinos.....	97
10.4. Método de tinción.....	98
<b>11. MUESTRAS DE TEJIDO DE PACIENTES CON RMS .....</b>	<b>98</b>
<b>12. DETERMINACIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA EN MUESTRAS</b>	
<b>DE TEJIDO DE RMS.....</b>	<b>99</b>
12.1. Obtención de RNA total de las muestras de tejido.....	99
12.2. Transcriptasa reversa .....	101
12.3. Reacción en cadena de la polimerasa .....	101
<b>13. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS</b>	
<b>MHC EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS.....</b>	<b>103</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>1. NIVELES DE RESISTENCIA GENERADOS POR DOSIS</b>	
<b>TERAPÉUTICAS DE ACTINOMICINA D EN RMS. LÍNEAS</b>	
<b>A-204-1 Y A-204-2.....</b>	<b>107</b>
<b>2. NIVELES DE RESISTENCIA A DROGAS DE USO CLÍNICO</b>	
<b>EN EL TRATAMIENTO DE RMS. LÍNEA RMS-GR.....</b>	<b>107</b>



<b>3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA DE LAS LÍNEAS A-204-1 Y A-204-2 CON OTRAS LÍNEAS RESISTENTES. LÍNEAS RD-DAC Y TE.32.7-DAC.....</b>	<b>110</b>
<b>4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MDR1/P-GLICOPROTEÍNA EN LÍNEAS DE RMS.....</b>	<b>113</b>
4.1. Expresión en la línea A-204 y sus derivados resistentes.....	113
4.2. Estudio comparativo con la expresión en las líneas RMS-GR, RD y TE.32.7 y sus derivados resistentes.....	113
<b>5. NIVELES DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA DE CLASE I EN LA LÍNEA A-204 Y SUS DERIVADOS RESISTENTES.....</b>	<b>117</b>
<b>6. ACCIÓN DEL VERAPAMILLO SOBRE LOS NIVELES DE RESISTENCIA Y LA EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I EN LA LINEA A-204 Y SUS DERIVADOS RESISTENTES .....</b>	<b>119</b>
6.1. Efecto modulador del bloqueo de P-glicoproteína sobre el grado de resistencia. ....	119
6.2. Efecto modulador del bloqueo de P-glicoproteína sobre la expresión de antígenos HLA de clase I .....	121
<b>7. ESTUDIO COMPARATIVO CON LAS LÍNEAS RMS-GR Y LOS DERIVADOS RESISTENTES DE RD Y TE.32.7.....</b>	<b>121</b>
7.1. Niveles de expresión de antígenos HLA de clase I.....	121
7.2. Modulación de los niveles de resistencia por la acción del agente verapamilo. ....	123
7.3. Modulación de la expresión de antígenos HLA de clase I por la acción del agente verapamilo.....	125
<b>8. MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES DE LAS LÍNEAS A-204 CON FENOTIPO RESISTENTE.....</b>	<b>128</b>
8.1. Estudio mediante microscopio óptico.....	128
8.2. Análisis mediante microscopio electrónico .....	129
<b>9. NIVELES DE EXPRESIÓN DE MDR1/P-GLICOPROTEÍNA EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS EMBRIONARIOS .....</b>	<b>132</b>

## Índice

10. NIVELES DE EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS EMBRIONARIOS .....	134
11. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA Y HLA DE CLASE I EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS EMBRIONARIO.....	136
<b>DISCUSIÓN</b> .....	137
<b>CONCLUSIONES</b> .....	167
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	171
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	210

# INTRODUCCIÓN

El cáncer es poco común en los niños y adolescentes. Los sarcomas de tejido blando infantiles constituyen un grupo de tumores malignos que se originan en el tejido primitivo mesenquimatoso, representando el 7% de todos los tumores infantiles. Dentro de ellos, los rhabdomyosarcomas (RMS), tumores de músculo estriado, y los sarcomas no diferenciados, representan más del la mitad de los tumores diagnosticados. Estos tumores son, por tanto, centro de interés para la investigación oncológica, dado que los resultados obtenidos en cuanto a sus características biológicas y sus posibilidades de tratamiento serán de aplicación en una población de pacientes relativamente importante.

Durante los últimos años se han producido avances significativos en el entendimiento de los procesos que acontecen durante la transformación de una célula muscular normal en una célula neoplásica. Estos hallazgos se han desarrollado de forma paralela a la comprensión del fenómeno de diferenciación miogénica, lo que en gran medida ha sido posible gracias al uso de modelos experimentales basados en cultivos de células rhabdomioblásticas. No obstante, aún estamos lejos de comprender cuales son todas las modificaciones que acontecen en estas células y cuales son las características biológicas esenciales que nos permitirán desarrollar tratamiento más eficaces contar ellas.

En relación a este último aspecto, ha sido notable el avance que se ha experimentado en la supervivencia de pacientes afectados de RMS, gracias al desarrollo de protocolos terapéuticos cada vez más eficientes. Dentro de éstos, destaca el uso de protocolos quimioterapéuticos que además de provocar lesión celular, inducen fenómenos de diferenciación y reducción de la capacidad de proliferación de las células tumorales (terapia de diferenciación). No obstante, entre los obstáculos más destacables de esta terapia se encuentra la aparición de un fenotipo celular resistente, conocido como **fenómeno de resistencias a multidroga** (MDR), que limita y en

muchos casos hace fracasar el tratamiento. El contacto de células tumorales, “in vivo” o “in vitro” con un citostático puede inducir por diferentes mecanismos la aparición de un fenómeno de protección celular frente al fármaco. El mecanismo de resistencia a multidroga mejor conocido es el que implica la expresión del gen *mdr1*.

El estudio in vivo o in vitro de las acción que ejercen los tratamientos usados habitualmente en los RMS sobre estas las células tumorales, las modificaciones que en ellas producen y las causas de su falta de efectividad, permitirán modificar dichos tratamientos o desarrollar otros que conduzcan a un mejor resultado en la respuesta del paciente.

## **1. RABDOMIOSARCOMAS**

En el año 1997, la Academia Estadounidense de Pediatría (American Academy of Pediatrics Section Statement Section on Hematology/Oncology, 1997) estableció las pautas para los centros de cáncer pediátrico y su función en el tratamiento del paciente pediátrico. Entre las conclusiones que citaba el mencionado informe se encontraba la confirmación de la mejoría en la supervivencia de niños y adolescentes con cáncer pero también, la necesidad de seguimiento e investigación de dicho tipo de patologías tanto en lo que se refiere a los efectos secundarios de la terapia antitumoral como al estudio de las causas del fracaso de dicha terapia. Dentro de este tipo de tumores se encontraban los RMS.

### **1.1. RABDOMIOSARCOMA: UN TUMOR DE ORIGEN MIOGÉNICO**

El RMS es un tumor maligno de tejidos blandos de origen musculoesquelético. Se presenta fundamentalmente en niños de 0 a 14 años, en donde representa en 3.5% de todos los casos de cáncer aunque también puede aparecer en edades más tardías afectando a adolescentes y a adultos jóvenes entre 15 y 19 años de edad, edades en las que representa

el 2% de todos los tumores (Ries y cols., 2005). El tumor primario suele localizarse en cabeza y cuello, en el conducto genitourinario y en las extremidades, aunque otras localizaciones como tronco, paredes torácicas, abdomen (incluyendo el retroperitoneo y tracto biliar) y región de perineo y ano, también pueden verse afectadas (Crist y cols., 1995). Desde el punto de vista de su pronóstico, se trata de una enfermedad curable, con una supervivencia a 5 años de más del 70% en aquellos pacientes que reciben una terapia combinada (Crist y cols., 1995; Crist y cols., 2001). La mayoría de casos de RMS se presentan de forma esporádica sin ningún factor de riesgo o de predisposición reconocible (Gurney y cols., 2005). No obstante, enfermedades de base genética como el síndrome de susceptibilidad al cáncer Li-Fraumeni (con mutación en la línea germinal p53) (Diller y cols., 1995), pueden asociarse a la presencia de RMS. Esta asociación también ha sido observada en la neurofibromatosis tipo I (Matsui y cols., 1993)

## **1.2. PRONÓSTICO DE LOS RABDOMIOSARCOMAS**

El pronóstico de los RMS se ha relacionado con el sitio donde se localiza la lesión primaria, la resecabilidad del tumor, la presencia de metástasis y su número y, por último, con el grado e histopatología de la enfermedad (Breneman y cols., 2001; Breneman y cols., 2003). No obstante, algunos estudios apuntan hacia la posibilidad de que la edad puede ser otro factor a tener en cuenta en dicho pronóstico (La Quaglia y cols., 1994). Algunos de los factores de los que hay evidencias de su implicación en el pronóstico de la enfermedad son los siguientes:

- \* La aplicación de una terapia intensiva con radiación y quimioterapia adecuada.
- \* La localización primaria del tumor, siendo los de pronóstico más favorable los que se diagnostican en el tracto biliar, la órbita, la cabeza y el cuello y la vagina (Spunt y cols., 2000).

- \* El tamaño del tumor; cuando el tamaño del tumor es de menos de 5 cm el tiempo de supervivencia se prolonga (Crist y cols., 1995; Lawrence y cols., 1997).
- \* La presencia de metástasis; dichas metástasis parecen estar correlacionadas con el tipo histológico del tumor (Breneman y cols., 2003) y suponen un hecho negativo desde el punto de vista del pronóstico.
- \* La localización de las metástasis; cuando la localización primaria del tumor es en la zona genitourinaria (excluyendo los de la vejiga y próstata) poseen mejor pronóstico.
- \* La afección de ganglios linfáticos regionales, lo que se corresponde con un peor pronóstico de la enfermedad.
- \* La presencia de enfermedad residual tras el tratamiento quirúrgico primario. En el estudio de Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) III, los pacientes con enfermedad residual macroscópica después de la cirugía inicial, tuvieron tasas de supervivencia a 5 años de aproximadamente el 70%. Esta tasa fue menor que la presentada en el mismo periodo por pacientes que no tuvieron tumor residual (mayor de 90%) y por pacientes que presentaron tumor residual microscópico después de la cirugía (aproximadamente 80%) (Smith y cols., 2001).
- \* La clasificación histológica del tumor, siendo el subtipo alveolar el que presenta una evolución menos favorable (Crist y cols., 1995):
- \* Y por último, la presencia de expresión tumoral de **marcadores de resistencia y en especial la detección de P-glicoproteína** que genera resistencia cruzada a diferentes tipos de drogas de uso habitual en el tratamiento de los RMS (Kuttesch y cols., 1996).

### 1.3. RABDOMIOSARCOMAS: CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

El estudio histológico de los RMS ha permitido diferenciar entre varios subtipos denominados embrionario, subtipo botrioide del RMS embrionario, alveolar y pleomorfo (Parham y cols., 2001).

De entre ellos, el subtipo embrionario es el que se presenta de forma más frecuente en los niños en donde, se ha llegado a estimar, que supone entre el 60%-70% de los RMS infantiles. Estos tumores suelen aparecer como un tumor primario de cabeza y cuello o en el tracto genitourinario. El RMS polimorfo, a diferencia de lo que ocurre con el RMS embrionario, predomina en pacientes de 30 a 50 años de edad. Este subtipo suele aparecer en la vagina, la vejiga, la nasofaringe o el tracto biliar, siendo extremadamente raros y representando tan sólo el 10% de todos los RMS. Por último, el subtipo alveolar (20% de los RMS) predomina entre los adolescentes y en pacientes con sitios primarios que incluyen las extremidades, tronco y región perineo/perianal (Parham., 2001). Los sarcomas de tejido blando no diferenciados también se presentan en los niños y se tratan de manera similar los RMS alveolares (Parham., 2001).

Desde un punto de vista molecular, los RMS embrionarios y alveolares poseen una serie de características que pueden ser utilizadas en la detección de enfermedad residual mínima durante el tratamiento (Merlino y cols., 1999). Así, las alteraciones de los genes PAX3 y PAX7 aparecen en un elevado número de casos de RMS alveolares, siendo de mejor pronóstico los que, aún presentando metástasis, poseen alterado el segundo de estos genes (Sorensen y cols., 2002). Por el contrario, la alteración del gen PAX3 parece asociada a pacientes con mayor edad y con tumores infiltrantes (Kelly y cols., 1997). Los RMS embrionarios suelen presentar alteraciones en el cromosoma 11 (Kelly y cols., 1997; Gordon y cols., 2001). Por otra parte, ambos tipos de tumores suelen poseer fenómenos de amplificación génica que pueden afectar a cromosomas enteros (Weber-Hall y cols., 1996). El



contenido celular de ADN suele estar cercano a la tetraploidía en los RMS alveolares mientras que en los embrionarios aparece con mayor frecuencia un estado de hiperdiploidía (1.1 a 1.8 x contenido normal de ADN) con ganancia en los cromosomas 2, 8, 12 y 13 (Pappo y cols., 1993; De Zen y cols., 1997).

#### 1.4. ESTADIOS EVOLUTIVOS DE LOS RABDOMIOSARCOMAS

El tratamiento de los RMS depende del agrupamiento quirurgicopatológico definido por su extensión y por la de la resección quirúrgica inicial. Diferentes estudios intergrupales del RMS han recomendado la siguiente definición de los grupos (Crist y cols., 1995).

<b>Grupo I</b>		RMS localizado, que ha sido totalmente resecado y no posee afección ganglionar regional (13%).
<b>Grupo II</b>	<b>IIA</b>	RMS localizado y resecado con enfermedad residual microscópica, pero sin complicación ganglionar regional.
	<b>IIB</b>	RMS con complicación ganglionar tumoral, con resección completa y sin enfermedad residual.
	<b>IIC</b>	RMS con complicación ganglionar, resecado pero con enfermedad residual microscópica en el lugar primario o presencia de afección de un ganglio regional más distal (del sitio primario).
<b>Grupo III</b>		RMS localizado con enfermedad residual macroscópica que incluye una resección incompleta o biopsia solamente del sitio primario (48%).
<b>Grupo IV</b>		RMS con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico (18% de todos los pacientes).

Además de los Grupos descritos, los protocolos actuales utilizan un sistema de clasificación pretratamiento basado en el sistema TNM. El estadio del paciente se determina clínicamente por el lugar y tamaño del tumor

primario, por el estatus ganglio-regional y por la presencia o ausencia de metástasis (Lawrence y cols., 1997).

**Estadio 1** Enfermedad localizada que incluye la órbita o cabeza y cuello (excluyendo sitios parameningeos), o región genitourinaria (excluyendo la vejiga y la próstata), o tracto biliar (sitios favorables).

**Estadio 2** Enfermedad localizada en cualquier otro sitio primario que no incluya los nombrados en la categoría del estadio 1 (sitios no favorables). Los tumores primarios deberán medir menos de 5 cm en diámetro y no deberá haber complicación ganglionar regional.

**Estadio 3** Enfermedad localizada en cualquier otro sitio primario. Estos pacientes difieren de los pacientes en el estadio 2 porque tienen tumores primarios mayores de 5 cm o complicación ganglio-regional.

**Estadio 4** Enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico.

Por último y para fines de protocolo, los pacientes se clasifican como de bajo riesgo, de riesgo intermedio, o de alto riesgo (Raney y cols., 2001).

**Riesgo bajo:** pacientes con RMS embrionario localizado que se presenta en lugares favorables (por ejemplo, en el estadio 1) (Grupos I, II, y III) y pacientes con RMS embrionario que se presenta en sitios desfavorables ya sea con enfermedad completamente resecada, (como en el Grupo I) o con enfermedad microscópica residual (como en el Grupo II).

**Riesgo intermedio:** pacientes con RMS embrionario que se presenta en sitios desfavorables con enfermedad residual macroscópica (por ejemplo, en el Grupo III), pacientes con RMS embrionario metastásico que se presenta en niños menores de 10 años de edad, y pacientes con RMS alveolar no metastásico o sarcoma no diferenciado en cualquier lugar.

**Riesgo alto:** pacientes con RMS metastático o sarcoma no diferenciado en el momento del diagnóstico, excepto los casos de RMS embrionarios en niños menores de 10 años de edad (Breneman y cols., 2001).

### 1.5. RABDOMIOSARCOMAS: OPCIONES TERAPÉUTICAS

En general, los RMS requieren terapia de modalidad múltiple. Esto implica el uso de cirugía, si es posible, seguida de quimioterapia. Se recomienda una nueva cirugía de segunda inspección para aquellos pacientes con tumores no resecado inicialmente. La radioterapia es una opción de tratamiento en pacientes con enfermedad residual microscópica y macroscópica. En general, de forma individual o combinada se utiliza:

<p>Cirugía  Resección del tumor, de la metástasis o de ambos  Quimioterapia  Radioterapia</p>
<p>Punción lumbar (para administrar los medicamentos y tratar las células cancerosas, si se encuentran en esta área)  Cuidados de apoyo (para los efectos secundarios del tratamiento)  Antibióticos (para prevenir y tratar infecciones)  Trasplante de médula ósea  Seguimiento continuo (para controlar la enfermedad y detectar reapariciones del tumor)</p>

**a. Tratamiento quirúrgico.** El principio básico para el tratamiento quirúrgico inicial en niños con RMS es la resección completa del tumor primario con un margen circundante de tejido normal y una muestra de los nódulos linfáticos obtenida de la órbita de drenaje linfático. Algunas excepciones a la resección de un margen normal la constituyen los tumores de órbita y de la región genitourinaria (Lawrence y cols., 1989). Esta regla también se suele aplicar en pacientes con cáncer metastásico y en aquellos con tumor residual microscópico después de una escisión inicial (Hays y

cols., 1989). No obstante y dado que el RMS puede surgir en sitios primarios musculares y mesenquimales, la acción quirúrgica deberá ajustarse a las características de cada localización.

En el caso de tumores de cabeza y cuello superficiales y no orbitarios se recomienda una escisión amplia, siempre y cuando sea factible, y la realización de una biopsia de ganglios linfáticos del cuello ipsilaterales. Una resección marginal más estrecha (<1mm) resulta aceptable cuando existen limitaciones anatómicas. Actualmente se han conseguido resecciones de tumores en áreas que anteriormente eran consideradas inaccesibles al manejo quirúrgico (áreas nasales, senos paranasales y fosa temporal) aunque sólo deben ser tomadas en consideración en niños con enfermedad regional local recurrente y enfermedad residual después de la quimioterapia y radioterapia. En el caso de pacientes con tumores primarios en cabeza y cuello que se consideran no resecables, la quimioterapia y radioterapia son la base del manejo primario (Pappo y cols., 2003; Raney y cols., 2000; Hawkins y cols., 2001).

Cuando el RMS se localiza en las extremidades se requiere una amplia escisión local acompañada de una extracción en bloque. La re-escisión primaria se utiliza si existen residuos microscópicos de la enfermedad (Lawrence y cols., 1987; Neville y cols., 2000). Recientemente, el Comité sobre el Sarcoma de Tejido Blando del Grupo Oncológico Infantil (STS-COG) ha recomendado la toma de biopsias de ganglios axilares o inguinales y femorales cuando la localización es en la extremidad superior o inferior respectivamente. El estudio de los ganglios linfáticos centinelas se puede usar para identificar los ganglios regionales que tienen mayor probabilidad de estar implicados. No obstante, los diferentes estudios realizados no han sido determinantes para comprobar la eficacia de esta prueba (Neville y cols., 2000).

Las localizaciones preferentes de los RMS en el tronco son las paredes abdominales o torácicas. El tratamiento quirúrgico sigue las mismas normas aplicadas a los RMS de las extremidades. La mayoría de los pacientes que presentan este tipo de tumores tienen una enfermedad localizada en la que se puede llevar a cabo una amplia resección. No obstante, cuando la localización es intratorácica o intraabdominal, la resección completa suele ser poco factible debido a la extensión de la masa tumoral en el momento del diagnóstico (Cecchetto y cols., 2003). En estos casos, son los RMS localizados en el árbol biliar los que presentan mejor pronóstico (Spunt y cols., 2000). En todos ellos, el empleo de quimioterapia aumenta la supervivencia de los pacientes (Cecchetto y cols., 2003)

Especial relevancia desde un punto de vista quirúrgico poseen los RMS localizados en el sistema genitourinario: área paratesticular, vejiga, próstata, vagina, útero y vulva. Las lesiones testiculares o del cordón espermático deberán ser extraídas por orquidectomía y resección del cordón espermático entero (Stewart y cols., 2003). Debemos tener en cuenta la elevada frecuencia de propagación linfática (26%) en este tipo de tumores (Ferrari y cols., 2005; Lawrence cols., 1989; Crist y cols., 2001). Algunos autores han propuesto la disección de los ganglios retroperitoneales e ipsilaterales en los niños mayores de 10 años con RMS paratesticular, ya que la capacidad del TAC para predecir la presencia de estos ganglios es discutida (Ferrari y cols., 2005; Stewart y cols., 2003). En los pacientes con RMS localizados en la vejiga, donde la resección total es una excepción, el enfoque terapéutico más aceptado suelen ser la utilización de quimioterapia y radioterapia intensiva para reducir la masa tumoral y con el objetivo de la recuperación de la vejiga desde el punto de vista funcional (Heyn y cols., 1997). Muchos pacientes, tras la cirugía, suelen mostrar rhabdomioblastos bien diferenciados aunque esto no parece estar relacionado con la recurrencia y no constituye un indicador para la realización de una cistectomía completa (Ortega y cols., 2000). En estos casos se recomienda

el uso de más quimioterapia, siendo la cistectomía una opción sólo si las células tumorales no desaparecen después de la quimioterapia y radiación (Heyn y cols., 1997). Cuando el RMS se localiza en la vagina/vulva/útero, la respuesta a la quimioterapia excluye la necesidad de cirugía radical inicial (Lawrence y cols., 1989). Una intervención quirúrgica conservadora para el RMS vaginal, con quimioterapia primaria y radiación adjunta cuando sea necesario, suele conducir a una supervivencia libre de enfermedad (Arndt y cols., 2001).

Ocasionalmente el RMS aparece en el perineo o el ano acompañándose con mucha frecuencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales. En estos casos se recomienda, si es posible, extirpar todo el tumor antes de comenzar la quimioterapia (Blakely y cols., 2003). El RMS localizado en el diafragma es extremadamente inusual siendo no macrorreseccable debido a su fijación a pulmón, grandes vasos o hígado (Raney y cols., 2000). Los pacientes con RMS de laringe serán tratados con quimioterapia y radiación después de llevarse a cabo la biopsia (Kato y cols., 1991).

Por último, la resección primaria de una metástasis está raramente indicada excepto para metástasis pulmonares aisladas (LaQuaglia., 1993). La enfermedad metastásica del pulmón después de radiación y quimioterapia deberá resecarse siempre y cuando se pueda preservar la función pulmonar adecuada.

**b. Tratamiento con quimioterapia.** En general, se considera que todos los pacientes con RMS deben recibir tratamiento con quimioterapia. No obstante, el tipo de tratamiento, las dosis y la duración depende del grado de riesgo que estos pacientes posean. En general los agentes más comúnmente utilizados son:

Vincristina
Actinomicina D
Doxorrubicina
Ciclofosfamida
Ifosfamida
Etopósido
Melfalan
Topotecan o irinotecan

*b.1. Tratamiento quimioterapéutico en RMS de bajo riesgo*

En los pacientes con RMS de pronóstico favorable el tratamiento debe perseguir mantener tasas de supervivencia altas (>90%) con los menores efectos secundarios posibles. Se incluyen dentro de estos pacientes los RMS embrionarios en sitio favorable (como en el estadio 1) y los RMS embrionarios con enfermedad completamente reseçada (como en el Grupo I) o enfermedad microscópica residual (como en el Grupo II) que se presentan en sitios desfavorables. Podemos considerar desde el punto de vista terapéutico varios subgrupos:

-En los RMS en sitios favorables con resección completa o enfermedad residual microscópica y ganglios linfáticos negativos, los RMS en sitios desfavorable con tumor pequeño y resección completa y los RMS orbitarios con enfermedad residual macroscópica, se han obtenido altas tasas de supervivencia con regímenes quimioterapéuticos que sólo usan vincristina y actinomicina D (Crist y cols., 1995).

-Cuando el RMS es orbitario una posibilidad es incluir en el tratamiento la ciclofosfamida junto a la vincristina y actinomicina D. Este régimen aumenta la tasa de supervivencia sin enfermedad (Crist y cols., 1995; Wharam y cols., 1997). No obstante, dado los efectos tóxicos a largo plazo asociados a la ciclofosfamida, se está tendiendo a tratar a estos pacientes con vincristina y actinomicina D y administrar radiación utilizando el campo y la dosis apropiada (Crist y cols., 1995).

-Por último, en los RMS en localizaciones favorables y ganglios linfáticos positivos, pacientes con sitios favorables (excluyendo la orbita) y enfermedad residual microscópica o ganglios linfáticos positivos y pacientes con un tumor grande en un sitio desfavorable sin enfermedad residual macroscópica, se aplica el régimen quimioterapéutico que usa vincristina y actinomicina D combinado con ciclofosfamida.

### *b.2. Tratamiento quimioterapéutico en RMS de riesgo intermedio*

Los pacientes con RMS de pronóstico intermedio tienen tasas de supervivencia del 55% al 70%. Esta categoría incluye pacientes con RMS embrionario en sitios no favorables con enfermedad residual macroscópica (como en el Grupo III), pacientes con RMS metastásico embrionario en niños menores de 10 años, y RMS no metastásico alveolar en cualquier lugar. En estos pacientes el uso de VAC (vincristina, actinomicina D, y ciclofosfamida) es el tratamiento quimioterapéutico estándar (Crist y cols., 1995).

Entre las modificaciones que se proponen para este tipo de tratamiento se encuentra el uso de vincristina, actinomicina D con ifosfamida (VAI) (Otten y cols., 1989) basado en la actividad de la ifosfamida contra el RMS (Pappo y cols., 1993), o bien la asociación de vincristina con ifosfamida y etopósido (VIE) (Arndt y cols., 1997). La combinación de ifosfamida y etopósido ha mostrado previamente una actividad significativa contra el RMS en los ensayos de fase II (Miser y cols., 1987). No obstante, diferentes experiencias han determinado que no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos con la aplicación de los tres tratamientos, lo cual confirma que VAC permanece como la quimioterapia estándar en niños con RMS de pronóstico intermedio (Crist y cols 2001). Lo que si se ha podido demostrar comparando pacientes con tumores de histología embrionaria que recibieron dosis altas de ciclofosfamida (o el equivalente de ifosfamida) y pacientes de características similares que recibieron dosis menores, es que la utilización de las primeras mejoran los resultados obtenidos en pacientes



con riesgo intermedio con tumores en sitios favorables o con tumores en desfavorables pero que han sido sometidos a un resección completa pero no en aquellos con RMS embrionario no resecable en sitios no favorables (Baker y cols., 2000).

### *b.3. Tratamiento quimioterapéutico en RMS de alto riesgo*

Se consideran dentro de este grupo los pacientes con RMS metastático en el momento del diagnóstico (estadio 4). (Breneman y cols., 2003). En este grupo la combinación de tres pares de fármacos suele ser el tratamiento de elección: ifosfamida/etopósido (IE), vincristina/melfalan (VM) (Breitfeld y cols.,2001), e ifosfamida/doxorubicina (ID) (Sandler y cols., 2001). La supervivencia de los pacientes que recibieron tratamiento con IE y ID fue similar (31% a 34%) y aportó mejores resultados que el tratamiento basado en VM (22%). (Breitfeld y cols., 2001). Aquellos pacientes con histología embrionaria y que presentan menos de dos localizaciones metastásicas, muestran un mejor pronóstico (supervivencia >47%) que otros pacientes con enfermedad metastásica (Breneman y cols., 2003).

### *b.4. Modificaciones de los regímenes de quimioterapia.*

Basándonos en la evolución clínica de los pacientes podemos modificar el tratamiento con citotóxicos en base a las siguientes pautas:

-Utilizar regímenes de multifármacos combinando ciclos de tratamiento similares al VAC con ciclos de tratamiento de otras combinaciones farmacológicas (Womer y cols., 2000).

-Añadir inhibidores de la topoisomerasa-I (topotecan o irinotecan) como ciclos de tratamiento al régimen VAC debido a su actividad antitumoral demostrada en modelos de RMS (Houghton y cols., 1992). En concreto, el topotecan es un fármaco activo contra el RMS con histología alveolar (Pappo y cols., 2001) y su combinación con ciclofosfamida es eficaz en pacientes

con RMS recurrente y en RMS en estadio 4 (Walterhouse y cols., 2004). Por otra parte, la combinación de irinotecan con vincristina en niños que presentan RMS metastásico (excluyendo pacientes menores de 10 años con tumores embrionarios) parece ser más efectiva (Walterhouse y cols., 2004). El uso exclusivo de irinotecan en exposiciones prolongadas posee acción antitumoral significativa en aquellos pacientes con infiltraciones graves de RMS embrionario y alveolar (Cosetti y cols., 2002).

-Por último, el uso de citotóxicos a dosis altas con rescate de células madre (SCR) ha sido evaluado en un número limitado de pacientes con RMS (Koscielniak y cols., 1997; Carli y cols., 1999). Este enfoque de tratamiento, por lo general emplea quimioterapia, radioterapia y manejo quirúrgico convencionales durante aproximadamente 6 meses para lograr reducción significativa del volumen tumoral. A continuación, los pacientes reciben uno o dos cursos de quimioterapia mieloablativa y posteriormente SCR. Los datos disponibles en la actualidad indican que el SCR no es beneficioso en la terapia del RMS desfavorable, y sólo debe usarse como parte de un estudio clínico controlado (Weigel y cols., 2001).

### **c. Tratamiento con radioterapia**

La radioterapia es un complemento terapéutico que tiene su indicación en el control local del tumor en pacientes con enfermedad residual microscópica o macroscópica después del tratamiento quirúrgico inicial y/o la aplicación de quimioterapia. Las recomendaciones para usar radioterapia dependen de la localización de la enfermedad primaria y del grado de la enfermedad. En general, los pacientes con RMS embrionario en los que es posible una resección tumoral completa (Grupo I) no necesitan radioterapia. Sin embargo, este tratamiento beneficia a los tumores del Grupo I con histología alveolar o no diferenciada (Schuck y cols., 2004).

El volumen tratado se determina en base al grado tumoral en el momento del diagnóstico antes de la resección y la quimioterapia, usando un margen de 2 cm e incluyendo los ganglios clínicamente afectados. El volumen irradiado también dependerá de la tolerancia del tejido normal, aunque en los casos de la enfermedad residual macroscópica se suele aplicar un tratamiento con dosis totales.

La dosis radioterapéutica depende fundamentalmente del grado de la enfermedad después de la resección quirúrgica primaria. En general, los pacientes con enfermedad residual microscópica (Grupo II) reciben hasta aproximadamente 4,100 cGy, pudiendo reducirse a 3,000-4,000 cGy cuando son tratados eficazmente con quimioterapia. Los pacientes con enfermedad residual macroscópica (Grupo III) que recibieron de 4,000 cGy a >5,000 cGy tuvieron tasas de recidivas locales/regionales de más del 30%. Las dosis más altas de radiación (>6,000 cGy) han estado relacionadas con grados inadmisibles de efectos tóxicos a largo plazo (Heyn y cols., 1986). Los pacientes del Grupo III reciben aproximadamente 5,000 cGy (Donaldson y cols., 1995).

Generalmente se administra quimioterapia 2 a 3 meses antes de la iniciación de la radioterapia, la cual se aplica durante 5 a 6 semanas en las cuales se evita el uso de fármacos radiosensibilizadores como la actinomicina D. En algunos casos, como en RMS parameningeos, está indicado el uso inmediato de la radioterapia (Raney y cols., 2002).

Estas pautas generales, como en el caso de la quimioterapia, pueden ser modificadas en base a la localización primaria del tumor (Donaldson y cols., 1995). Así:

-Los RMS de localización parameningea con extensión intracraneal contigua al tumor primario o parálisis un par craneal (Raney y cols., 2002) deben recibir tratamiento del tumor primario con un margen de 2 cm.

(Paulino., 1999). Los pacientes con extensión intracraneal deberán comenzar a recibir radioterapia antes de dos semanas una vez hecho el diagnóstico.

- Los RMS localizados en la vejiga/próstata con una masa pelviana que provoca obstrucción deben recibirla después de la quimioterapia inicial. Si la localización es genitourinaria se deben proteger los ovarios.

-En RMS orbitarios, se debe limitar la radioterapia que afecta a la córnea, la glándula lagrimal y el quiasma óptico.

-En los raros casos de RMS con enfermedad difusa de las meninges o con múltiples metástasis cerebrales se puede usar la radiación cerebral total además de radioterapia/quimioterapia para el tumor primario o, si es necesario, la irradiación de la columna dorsal en coordinación con otras terapias.

Por último, debemos comentar que la braquiterapia que emplea implantes intracavitarios o intersticiales para el control local de la enfermedad, está en estos momentos en investigación clínica. No obstante, este tipo de terapia ha sido empleada fundamentalmente en niños que presentaban RMS primarios de diferentes histologías en vagina o vulva (Nag y cols., 2001). Este tratamiento, aunque en un número reducido de casos de RMS vaginal, ha sido asociado a una alta tasa de supervivencia (85%) con el mantenimiento de una vagina funcional. Otros sitios, especialmente la cabeza y el cuello, han sido tratados con braquiterapia (Nag y cols., 1999).

## **1.6. RABDOMIOSARCOMA INFANTIL RECURRENTE**

La mayoría de los pacientes con RMS recurrente tienen un pronóstico extremadamente precario a pesar de que, en algunos casos, se puede lograr una remisión completa con terapia secundaria. Dentro de este grupo de pacientes, el pronóstico suele ser más favorable (tasas de supervivencia a cinco años del 50% al 70%) en aquellos en los que la enfermedad es

clasificada como estadio I o grupo I e histología embrionaria o botrioide. Éstos suelen presentar una recurrencia sólo local o regional y son los que evolucionan más favorablemente (Pappo y cols., 1999).

Aunque el tratamiento en estos casos sigue siendo discutido y depende en gran medida de la localización de la recidiva y el tratamiento previo, suele aplicarse como terapia de elección la combinación de ifosfamida/etopósido, sobre todo, si previamente no fueron usados estos fármacos (Miser y cols., 1987). Una alternativa a este protocolo puede ser el uso de carboplatino con etopósido (Klingebiel y cols., 1998) o la combinación de ifosfamida con carboplatino y etopósido (Kung y cols., 1995). La combinación de ciclofosfamida junto con topotecan ha mostrado ser activa en pacientes con enfermedad recurrente o refractaria. Todavía está en fase experimental el uso de quimioterapia intensiva seguida de una reinfusión autóloga de la médula ósea, siendo los resultados hasta el momento de dudoso beneficio para el paciente (Weigel y cols., 2001).

Sobre la base de los datos provenientes del Grupo de Estudio Intergrupar del Rbdomiosarcoma (Pappo y cols., 1999), se considera que los pacientes con recaídas que tienen un pronóstico más favorable pueden recibir doxorubicina y ciclofosfamida alternando con ifosfamida y etopósido, los de pronóstico más desfavorable pueden seguir un programa de dos administraciones de irinotecan en combinación con vincristina seguidas de tratamiento con doxorubicina y ciclofosfamida alternando con ifosfamida y etopósido. No obstante, el desarrollo de nuevos fármacos con diferente mecanismo de acción, que ahora están en evaluación clínica en pruebas de fase I y fase II, deberán ser considerados para el tratamiento de estos pacientes. Así, estudios recientes parecen demostrar que en los RMS recurrentes, la utilización de agentes como la vinorelbina sin ningún otro agente asociado (Casanova y cols., 2002) o el uso del irinotecan (Cosetti y cols., 2002) mejoran el pronóstico.

## **2. CÉLULA MUSCULAR, ORIGEN DE LOS RABDOMIOSARCOMAS**

Los RMS derivan de células musculares estriadas. Estas células tumorales, además de las clásicas alteraciones en su capacidad de proliferación, presentan alteraciones características de su forma, membrana y estructura citoplasmática, destacando las que tienen lugar en la conformación del citoesqueleto, lo que hace posible el diagnóstico histopatológico.

### **2.1. EL CITOESQUELETO DE LA CÉLULA MUSCULAR**

Las células de músculo esquelético, también denominadas fibras musculares, presentan en el citoplasma una compleja red de filamentos proteicos denominada citoesqueleto celular. Éste es responsable de los movimientos celulares y de los cambios de forma de la célula (Sommer y Jennings, 1986). Existen tres tipos de filamentos proteicos: los microfilamentos o filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios.

Las miofibrillas son las representantes de la especialización que ha sufrido este tipo celular. Estos elementos cilíndricos de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, ocupan toda la longitud de la célula, son responsables de la su apariencia y actúan como los verdaderos elementos contráctiles de la misma (Alberts y cols., 1989). Sus unidades estructurales se denominan sarcómeros (2.5  $\mu\text{m}$  de longitud), se repiten regularmente y originan una serie de bandas claras y oscuras alternantes (Forbes y Sperelakis, 1984). La banda oscura, o banda A que ocupa el centro (1.5  $\mu\text{m}$ ), posee en la parte central una región clara denominada zona H (dividida en dos partes por la línea M). La banda clara o banda I se sitúa a ambos lados de la banda A y presenta en el centro la denominada línea o disco Z que separa un sarcómero del siguiente. Así pues, cada sarcómero está comprendido entre dos líneas Z adyacentes (Offer, 1974).

En el sarcómero existen dos grupos de filamentos proteicos paralelos y parcialmente superpuestos. Los filamentos delgados (Warber y Potter, 1986) se extienden desde la línea Z hasta la banda A donde penetran, sin llegar a alcanzar la zona H. Los filamentos gruesos ocupan la banda A de un extremo al otro. Por lo tanto, en la banda A se superponen ambos tipos de filamentos, en la banda I sólo se encuentran los filamentos delgados y en la zona H de la banda A sólo existen filamentos gruesos.

## 2.2. LOS FILAMENTOS DELGADOS DEL SARCÓMERO

La principal proteína de los filamentos delgados es la **actina** (Vandekerckhove y Weber, 1978; Shah y cols., 1982; Hirano y cols., 1987; Korn, 1982). Su disgregación resulta en moléculas de 43.000 daltons de peso molecular (actina globular o actina G) (Korn, 1982; Vandekerckhove y Weber, 1978) que pueden polimerizar (actina F) (Elzinga y Phelan, 1984). Al microscopio electrónico, se presenta como una doble cadena enrollada en hélice hacia la derecha y con entrecruzamientos cada 36 nm. La actina guarda íntima relación con otras dos proteínas, la tropomiosina y la troponina para las que posee sitios de unión (Milligan y cols. 1990).

La troponina y la tropomiosina, constituyen aproximadamente un 10% de la composición de los filamentos delgados (Albert y cols., 1989). Su misión es regular la contracción a través del  $\text{Ca}^{+2}$ . La **troponina** (Tn) es un complejo de tres proteínas: troponina C (TnC), troponina I (TnI) y troponina T (TnT), responsable de aportar la sensibilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  para la activación miofibrilar. El calcio se liga a la subunidad TnC (18.459 daltons) y transporta la señal a la TnT (38.000 daltons) y a la TnI (23.550 daltons) (Potter y Johnson, 1982). Las interacciones entre las tres subunidades de troponina y su unión al  $\text{Ca}^{+2}$  y/o su fosforilación provocan una cascada de cambios en la interacción de las otras proteínas integrantes de la miofibrilla (tropomiosina, actina y miosina) que da lugar a la contracción.

La **tropomiosina** es una molécula compuesta por dos subunidades (alfa y beta) (284 aminoácidos cada una) con un peso molecular de 34.000 y 36.000 daltons respectivamente (Eisenberg y Kielley, 1974; Yamaguchi y cols., 1974). Las dos cadenas polipeptídicas de la tropomiosina adoptan una estructura secundaria en alfa-hélice que se estabiliza mediante puentes de hidrógeno entre los grupos CO y NH de péptidos cercanos. La tropomiosina muscular se une a la F-actina, y aumenta la sensibilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  de la actomiosina en presencia de troponina. En conjunción con la troponina, regula la contracción de los filamentos delgados por medio del  $\text{Ca}^{+2}$ .

Por último, la **alfa-actinina** un homodímero con un peso molecular de 95.000-100.000 daltons (Robson y Zeece, 1973; Suzuki y cols., 1976; Ebashi y cols., 1964; Rosenberg y cols., 1981) que se localiza en el disco Z, actúa como un punto de anclaje o centro de organización para la preformación de filamentos de actina, manteniendo empaquetados los filamentos delgados entre sí (Robson y Zeece, 1973).

### 2.3. LOS FILAMENTOS GRUESOS DEL SARCÓMERO

Los filamentos gruesos están compuestos principalmente por **miosina** (Page, 1974), una proteína de 500.000 daltons y constituida por seis subunidades polipeptídicas: dos cadenas pesadas (200.000 daltons) y dos pares de cadenas ligeras (20.000 y 16.000 daltons) (Hoh y cols., 1978). Las cadenas pesadas poseen un dominio correspondiente al extremo carbono terminal (hélices enrolladas) que se denomina cola del filamento grueso y otro dominio en el extremo amino terminal que junto con un par de cadenas ligeras distintas, forma una cabeza globular (Murphy, 1983). En los filamentos gruesos, cada una de las moléculas de miosina se orienta de manera que las "colas" se localizan en el centro del filamento, estando las "cabezas" de miosina en dirección opuesta a éstas (Kimbrough, 1986).



La **miomesina**, una proteína de 185.000 daltons, une transversalmente los filamentos gruesos de miosina a nivel de la línea M, manteniendo de esta forma la estructura de los mismos (Wang, 1985). El **titín** es una proteína de un sistema de filamentos proteicos poco solubles que posee 2.500 daltons de peso molecular y que corre paralela a los filamentos delgados y gruesos en el sarcómero, conectando los filamentos gruesos con el disco Z (Wang, 1985).

#### **2.4. EL PROCESO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.**

La interacción de la actina con la miosina produce una fuerza contráctil procedente de la conversión de la energía química en energía mecánica. La energía para la contracción muscular procede de la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico (Pi). La hidrólisis del ATP durante la contracción muscular es una consecuencia directa de la interacción de la miosina con la actina. La miosina actúa como una enzima que puede hidrolizar ATP (ATPasa). La estimulación de la ATPasa de la miosina por parte de los filamentos de actina refleja una asociación física entre ambas. Esta asociación no afecta al paso en el que la miosina hidroliza el ATP, sino que la actina provoca una liberación más rápida del ADP y del Pi de la molécula de miosina, que queda así libre para unir otra molécula de ATP e iniciar de nuevo la reacción (Adelstein y Eisenberg, 1984; Aránega, 1991). Tanto la hidrólisis del ATP como la unión con la actina ocurren en la cabeza globular de la molécula de miosina. Los filamentos gruesos y los delgados se deslizan unos sobre otros produciendo la fuerza mecánica para la contracción muscular. Una cabeza de miosina, portadora de los productos de una hidrólisis anterior de ATP (ADP y Pi), se desplaza desde su posición en el filamento grueso hasta la proximidad inmediata de una subunidad vecina de actina del filamento delgado más cercano. Cuando la miosina se une con la actina, el ADP y el Pi se liberan de la cabeza de miosina, haciendo que ésta se incline, empujando así a todo el resto del filamento grueso. Al final de este

"golpe de fuerza", una nueva molécula de ATP se une a la cabeza de miosina y la separa de nuevo del filamento de actina. La hidrólisis del ATP unido, relaja rápidamente la cabeza de miosina hasta su conformación original y la prepara para un segundo ciclo. Se cree, por consiguiente, que cada cabeza de miosina "anda" a lo largo de un filamento adyacente de actina. Al sufrir un cambio cíclico de conformación, la cabeza de miosina empuja el filamento de actina, haciendo que este se deslice sobre el filamento grueso. Cuando una cabeza de miosina se ha separado del filamento de actina, es arrastrada por la acción de las otras cabezas de miosina del mismo filamento grueso, de modo que una fotografía instantánea de todo un filamento grueso de un músculo en contracción mostraría algunas de las cabezas de miosina unidas a los filamentos de actina, mientras que otras estarían separadas. Esto implica que tanto los filamentos delgados como los gruesos no modifican su longitud durante la contracción debido a que se deslizan unos sobre los otros (Huxley, 1969).

En condiciones de reposo, las proteínas tropomiosina y troponina pertenecientes a los filamentos delgados, inhiben la formación de puentes o uniones cruzadas entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina, inhibiendo por tanto la contracción muscular (Perry, 1979). Las citadas proteínas actúan como *reguladoras de la contracción celular*, actividad que depende de la presencia de niveles adecuados de ión  $\text{Ca}^{+2}$  en el interior de la célula (Langer, 1984). En estado de reposo la tropomiosina bloquea estéricamente los sitios activos de la actina que pueden interaccionar transversalmente con las cabezas de miosina. Al aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ , éste se une a la troponina C, se inhibe la unión de la troponina I con la actina, y se produce un cambio en la conformación de la tropomiosina. La tropomiosina se altera ligeramente en su posición y su desplazamiento deja libre los centros activos de unión entre la miosina y la actina, produciéndose la interacción de ambas y el inicio de la contracción. La posterior liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde la troponina C determina que la tropomiosina bloquee de

nuevo la interacción entre miosina y actina, produciéndose la relajación (Taylor y Amos, 1981).

## 2.5. LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS

Los filamentos intermedios, con un diámetro (8 a 12 nm) entre el de los filamentos miosina y el de los filamentos de actina, forman una red citoplasmática resistente y estable en la mayoría de las células eucariotas (Osborn y Weber, 1986). Suelen disponerse formando una especie de "cesta" alrededor del núcleo desde donde se extienden delimitando curvas hacia la periferia celular (Geiger, 1987). Sus unidades proteicas difieren en antigenicidad, peso molecular y punto isoeléctrico, lo que permitió su clasificación en cinco tipos (Lazarides, 1980): filamentos de queratina o tonofilamentos, que se encuentran en las células epiteliales o de procedencia epitelial; filamentos de desmina que se encuentran en las células musculares; filamentos de vimentina en células mesenquimales o de origen mesenquimal, aunque también observados en células musculares en estrecha relación con desmina; los filamentos de proteína neurofibrilar, encontrados en las neuronas y los filamentos de proteína acidógena fibrilar glial, presentes en la astrogliá.

La principal función de los filamentos intermedios es proporcionar soporte mecánico a la célula y su núcleo, formando una red intracelular que permite resistir fuerzas externas y soportar mecánicamente a los sarcómeros del músculo. Las proteínas más características de los filamentos intermedios en las células de músculo esquelético son la desmina y la vimentina (Thornell y cols., 1984).

**La desmina** (50.000-55.000 daltons) (Geisler y Weber, 1988) está constituida por cadenas que se enrollan entre si para formar los protofilamentos, subunidades tetraméricas que en condiciones fisiológicas se ensamblan espontáneamente formando filamentos de 10 nm de diámetro.

Está presente en las células músculo esquelético, liso y cardiaco y se localiza en la línea Z de las miofibrillas, entre las líneas Z de miofibrillas adyacentes (Tokuyasu, 1984) y en los espacios situados entre las miofibrillas y la membrana plasmática. En esta última localización se asocia a los desmosomas que permiten que las células musculares se unan a las células adyacentes (Lazarides, 1978). Actúa como un soporte mecánico de la célula muscular manteniendo interconectadas entre sí las miofibrillas musculares y a éstas con la membrana plasmática a nivel de las líneas Z donde se ubica la proteína.

La **vimentina**, con un peso molecular de 52.000-58.000 daltons, (Brown y cols., 1976), se estructura como un tetrámero. Las cadenas se enrollan entre sí para formar los protofilamentos, que en condiciones fisiológicas se ensamblan espontáneamente en filamentos extremadamente estables que se distribuyen en la región central del citoplasma, alrededor de la membrana nuclear. Actúan como soporte mecánico del núcleo (Virtanen y col., 1979), jugando un papel importante en la transmisión de señales desde la membrana plasmática al núcleo (Georgatos y Blobel, 1987).

Por último, **las citoqueratinas**, proteínas características de la mayoría de tipos de células epiteliales, (Osborn y Weber, 1983; Franke y cols., 1978; Fuchs y cols., 1987), también aparecen en músculo liso, miometrio y músculo estriado cardiaco (Gown y cols., 1988; Brown y cols., 1987) así como en otro tipo de células (Coindre y cols., 1988; Miettinen y Rapola, 1989)

## **2.6. DIFERENCIACIÓN MUSCULAR. EL PROCESO DE LA MIOGÉNESIS.**

Las células musculares adultas se originan a partir de otras que proceden de los somitos del embrión y que se llaman mioblastos. Los mioblastos, células muy indiferenciadas, proliferan y posteriormente se fusionan entre sí dando lugar a células musculares plurinucleadas. El

acontecimiento de la fusión está acoplado a los acontecimientos del ciclo celular de forma que sólo se produce durante la fase G1. La renovación del tejido muscular en el adulto sólo es posible a partir de mioblastos satélites que quedan en estrecho contacto con las fibras musculares maduras. Estas son consideradas las células madre del músculo esquelético.

La diferenciación celular miocítica abarca tres fases paralelas:

1. Diferenciación morfológica, por la cual los mioblastos mononucleados se fusionan en miotubos.

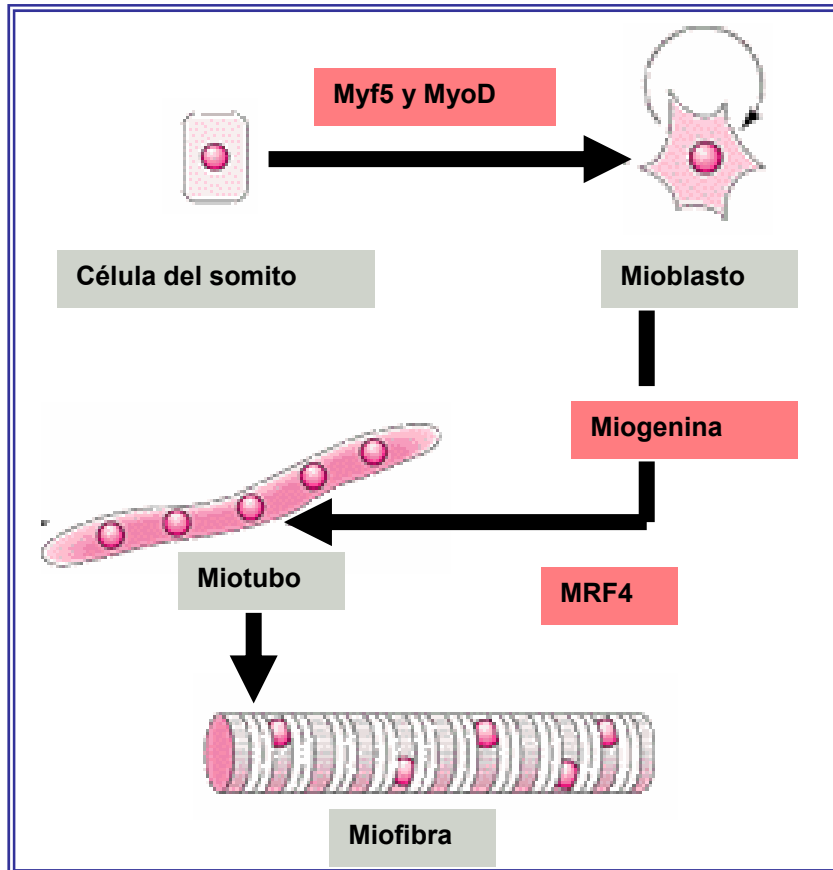
2. Diferenciación subcelular, que se manifiesta con la expresión cuantificada de proteínas específicas a nivel citoplasmático y citoesquelético.

3. Diferenciación molecular, que produce la represión de genes no musculares y la inducción de genes específicos de estructura muscular (Schwartz y Rothblum 1981; Hayward y cols., 1983).

El proceso de fusión (transición de mioblastos a células musculares multinucleadas) se acompaña de cambios en la síntesis de proteínas (de citoesqueleto, enzimas metabólicas -creatin fosfoquinasa- y receptores -acetil colina-). Este fenómeno repercute en la síntesis de otras proteínas que dejan de producirse o lo hacen de forma momentánea, interviniendo en el establecimiento del aparato contráctil (Olson y Capetanaki, 1989) y en la arquitectura citoplasmática con el reemplazo programado de las isoformas de estas proteínas (Van Horn y Crow, 1989).

El proceso de diferenciación está asociado temporalmente con una baja regulación de productos génicos específicos de mioblastos y una alta regulación de proteínas especializadas de las fibras musculares maduras (Olson y Capetanaki, 1989). La diferenciación de mioblastos requiere la activación coordinada de cerca de 20 genes (Enkemann y cols., 1990; Miwa y Kedes, 1987; Jaynes y cols., 1988; Yutzey y cols., 1989). En los últimos

años se ha descubierto un grupo de cuatro genes que parecen regular esta función: MyoD1 (Davis y cols., 1987), miogenina (Edmondson y Olson, 1989), Myf5 (Braun y cols, 1989) y herculin/MRF4 (Miner y Wold, 1990).



Diversas experiencias basadas en la transfección de estos genes, han demostrado que son capaces de inducir la expresión de genes músculo-específicos en diferentes tipos de células (Choi y cols., 1990) y que poseen diferentes funciones en el desarrollo muscular, dado su distinto nivel de expresión a lo largo del mismo. Así, en estadios muy precoces del desarrollo y antes de poder observar la síntesis de estas proteínas, genes como el MyoD1 y la miogenina están sobrepresados (Tonin y cols., 1991). Otros genes como Myf5 y MRF4 se activan ya iniciado el proceso de diferenciación y su papel como reguladores de este proceso está poco claro.

Por último, numerosos agentes entre los que están los protooncogenes, han sido relacionados con el control de la diferenciación muscular. Se ha demostrado que la expresión de diferentes protooncogenes en mioblastos en cultivos primarios y establecidos, es capaz de inhibir la diferenciación miogénica (Alema y Tato, 1987; Schneider y Olson, 1988; Lassar y cols., 1989). Diferentes trabajos apuntan hacia la estrecha correlación existente entre las modificaciones de la expresión de la familia de genes Myo a lo largo del proceso de diferenciación y los cambios observados en la expresión de protooncogenes. Así, el oncogen c-myc, actúa sobre isoenzimas musculares como la creatin kinasa (Schneider y Olson, 1988). Su colaboración con el gen ras parece tener un efecto decisivo sobre la formación de canales de calcio funcionales en los miotubos (Caffrey y cols., 1987). Este gen parece actuar alterando la actividad enzimática de la PKC (Protein Kinasa C) lo que produciría una disminución de la expresión del gen MyoD1. Otros oncogenes, como c-fos, también han sido asociados a la baja regulación del gen MyoD1, produciendo una inhibición de la diferenciación miogénica en líneas derivadas de mioblastos (Konieczny y cols., 1989; Lassar y cols., 1989; Vaidya y cols., 1991; Falcone y cols., 1985). Genes como el erb y fps son capaces de inhibir la fusión de los mioblastos para formar miotubos y la expresión de genes de proteínas contráctiles (Falcone y cols., 1985; Alema y Tato, 1987). Serán necesarias futuras investigaciones para determinar la secuencia correcta de expresión génica que tiene lugar durante la diferenciación muscular terminal.

### **3. RESISTENCIA A MULTIDROGAS, UNA LIMITACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LOS RABDOMIOSARCOMAS**

El desarrollo del fenómeno de resistencia a multidrogas (MDR) durante el curso del tratamiento quioterapéutico de un paciente con RMS, representa la principal limitación en este tipo de terapia. A pesar de los avances en el uso de drogas quimioterapéuticas, una gran parte de cánceres humanos son

resistentes a la terapia, bien desde el inicio del tratamiento (resistencia inherente), bien después de una respuesta parcial al mismo (resistencia adquirida).

Las alteraciones bioquímicas y genéticas responsables del fenotipo de resistencia a drogas en las células tumorales han sido objeto de una intensa investigación desde hace más de 25 años. Debido a la inherente dificultad del estudio de la resistencia *in vivo*, se han desarrollado un gran número de modelos *in vitro* de diferentes tejidos y especies. En general, las células cultivadas de tejidos sensibles a drogas son sometidas a un proceso de selección, incrementado progresivamente las concentraciones subletales de un único agente citotóxico, que conlleva la obtención de células con un fenotipo adquirido de resistencia.

Estos estudios han demostrado la existencia de varios mecanismos que explican el desarrollo de resistencia a drogas como son la exclusión de drogas desde la célula tumoral, el fallo en la activación de la prodroga hacia su forma activa, el incremento de la detoxificación, la alteración de la “diana” de la droga y el incremento de la capacidad de reparación de la célula después de la lesión o fallo para originar una respuesta apoptótica. Muchos de estos factores pueden coexistir “in vivo”; algunos son una característica propia del tipo de tumor, otros aparecerán “de novo” durante la progresión de la enfermedad. Uno de los mecanismos más extensamente analizado es el sistema basado en la expresión de ***P-glicoproteína (P-gp)***.

### **3.1. RESISTENCIA MEDIADA POR P- GLICOPROTEÍNA**

La P-gp, descrita por Juliano y Ling (1976) es una glicoproteína de membrana plasmática de 170 kD que actúa como una bomba de eflujo de drogas dependiente de energía (Avendano y cols., 2002). Es codificada por el gen MDR1, gen que pertenece a la gran superfamilia de genes relacionados con transportadores ABC que enlazan a ATP (Dean y cols.,



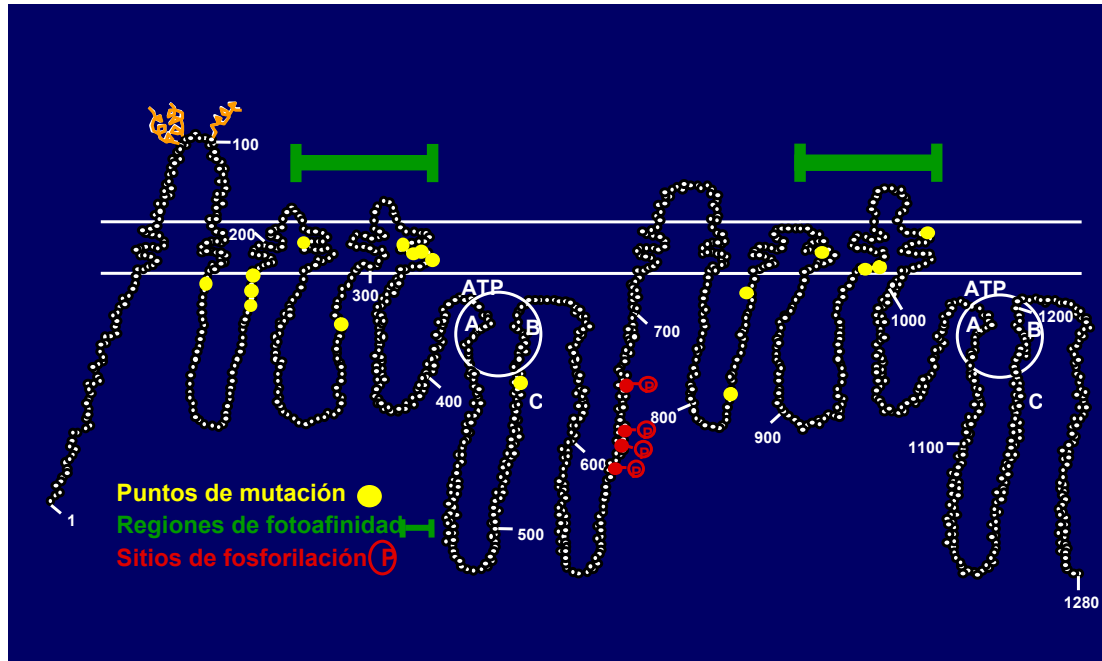
2001). Existen varias P-gps codificadas por familias de genes compuestas por dos miembros, en el caso de los humanos, y de tres, en roedores. Hoy diferenciamos entre P-gps de clase 1, que transportan drogas, y P-gps de clase 2, que no transportan drogas. Las primeras son las que incluyen a MDR1 humano, *mdr3* (o *mdr1a*) además de *mdr1* (o *mdr1b*) de ratón, P-gp1 y P-gp2 de hámster y P-gp1 y P-gp2 de rata.

Todos los transportadores ABC (más de 100) poseen una estructura bipartita con múltiples juegos de segmentos de membrana y un dominio hidrofílico que enlaza a nucleótidos. En los transportadores ABC eucarióticos, normalmente, un único gen codifica para la parte integral de membrana y para los nucleótidos enlazantes (Hrycyna y cols., 2001). Se han descrito hasta siete subfamilias dentro de la familia de genes ABC, denominados desde ABCA hasta ABCG, que son expresados en tejidos normales y malignizados. En general este conjunto de proteínas están involucradas en un amplio rango de transportes dependientes de energía a través de la membrana citoplasmática o de membranas intracitoplasmáticas.

### **3.2. ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA**

La P-gp humana contiene 1280 aminoácidos y un importante grupo glucídico. Se caracteriza por presentar dos motivos homólogos, existiendo un 43% de identidad entre uno y otro y por contener en cada uno de estos motivos 6 zonas de una veintena de aminoácidos que han sido reconocidos como dominios transmembrana que forman bucles extracelulares cortos e intracelulares largos (Sauna y cols., 2001). En realidad, la presencia de doce dominios transmembrana y dos “pliegues” de enlace a nucleótidos (NBD) constituye la unidad funcional mínima para muchos transportadores ABC de mamíferos. Los sitios NBD son los responsables de la unión e hidrólisis del ATP y su estructura se encuentra muy conservada. Los dominios contienen los sitios de unión a la droga que están localizados en la parte interna y son lo suficientemente flexibles como para aceptar diversas drogas (Safa, 2004).

Esta estructura le permite formar un poro a través de la membrana plasmática que actuando como un canal permite el paso de las drogas citotóxicas.



### 3.3. GLICOSILACIÓN, FOSFORILACIÓN Y ACTIVIDAD ATPASA DE P-GLICOPROTEÍNA

La P-gp es sintetizada como un precursor no glicosilado (120-140 kD) que posteriormente se procesa hasta su forma madura con un mayor tamaño molecular. La glicosilación, localizada en la mitad N-terminal dentro del primer "loop" (asa) extracelular, es requerida para la eficiente traslocación de la P-gp a la membrana plasmática (German, 1996).

Por otra parte, diferentes estudios han correlacionado los niveles y/o actividades de las protein kinasas (PK) en células resistentes a drogas con el estado de fosforilación de la P-gp y éste, con la resistencia a drogas y con su acumulación. Han sido, no obstante, las experiencias de transfección las que han demostrado la asociación de la isoforma PKCa con el incremento

de la fosforilación de la P-gp y el incremento, a su vez, de la resistencia celular a drogas (Zhang y cols., 2004).

Diferentes análisis bioquímicos y/o de transfección del gen *mdr* establecen que P-gp es una proteína que enlaza ATP a través de los NB del extremo N-terminal (Sakaeda y cols., 2004). Esta actividad se relaciona con el mecanismo de acción de P-gp aunque todavía, en la actualidad, existen algunas dudas en cuanto a su funcionamiento. El transporte de la droga es un transporte activo que utiliza energía suministrada por la hidrólisis de ATP y que afecta a muchos sustratos no relacionados estructuralmente. Entre las evidencias que han llevado a esta conclusión se encuentran que:

1. La P-gp enlaza drogas análogas aunque mutaciones simples dentro o cercanas a los dominios transmembrana alteran dicho enlace.

2. La P-gp es un miembro de la superfamilia de transportadores ABC que muestra homología con proteínas de membrana eucariotas y procariontes las cuales sirven como transportadores para diferentes sustratos;

3. Los niveles de expresión de P-gp se correlacionan con la resistencia a drogas de células seleccionadas o de células transfectadas con *mdr*.

4. Las células resistentes presentan bajos niveles de acumulación intracelular de drogas a diferencia de las sensibles, siendo su única diferencia los niveles de expresión de P-gp.

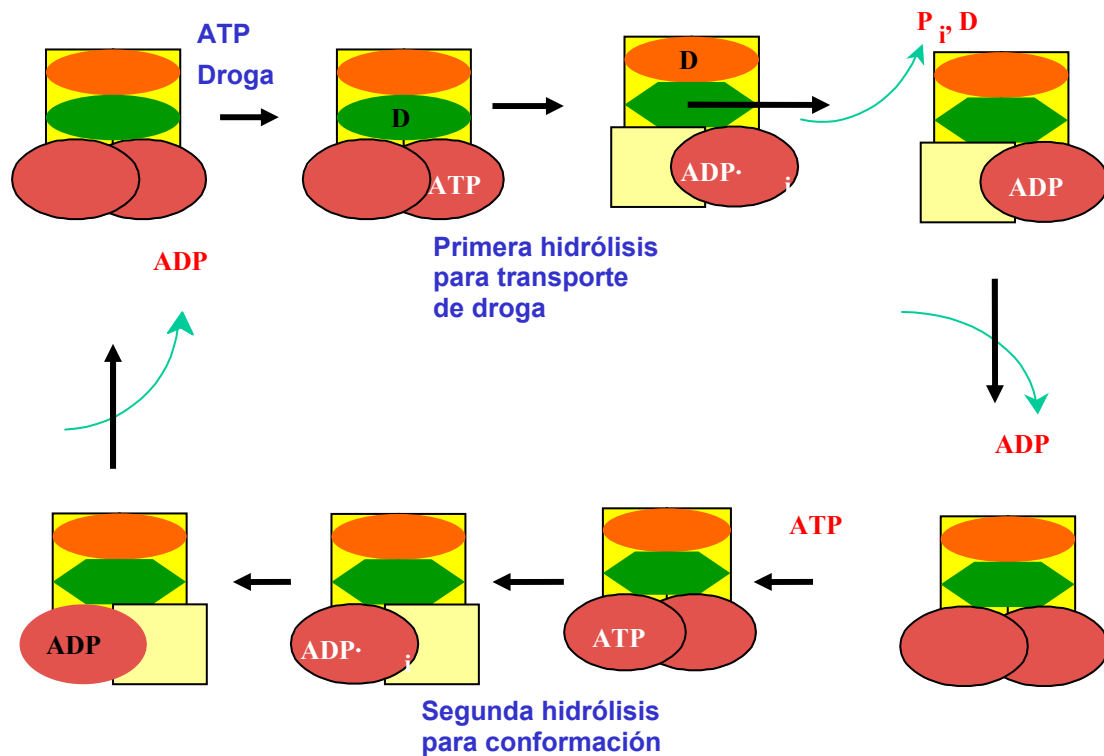
Se ha postulado que P-gp posee dos sitios de unión a sustrato con diferente afinidad y que la droga puede interactuar con uno de ellos o con los dos (Doppenschmit y cols., 1999). Esto explicaría en parte por qué esta proteína puede enlazar con una gran heterogenicidad de los sustratos entre los que se encuentran:

**Sustratos de P-gp**

<b>Citotóxicos</b>	<b>Antibióticos</b>
actinomicina D, etoposido, paclitaxel , docetaxel, doxorubicina , daunoarubicina, vinblastina , vincristina , irinotecan , topotecan , mitoxantrona, mitomicina C	eritromicina, levofloxacina, sparfloxacina
<b>Bloqueadores de calcio y metabolitos</b>	<b>Agentes lipídicos</b>
Verapamilo, diltiazem, nifedipina, mibefradil	atorvastatina, lovastatina
<b>Fármacos cardiacos</b>	<b>Inmunosupresores</b>
digoxina, digitoxina, quinidina	ciclosporina A, rapamicina
<b>Esteroides</b>	<b>Otros</b>
aldosterona, dexametasona, estradiol, hidrocortisona	debrisoquina, losartan, morfina, rifampina, fenitoina, rodamina 123, triton X-100, halofantrina, amitriptilina

Dey y cols. (1999), han llegado a proponer un modelo por el que en realidad, los dos sitios de unión al sustrato forman un único sitio de enlace. En este modelo, la droga se une inicialmente a uno de ellos, produciéndose hidrólisis de ATP y junto a la presencia de un ión fosfato se originan cambios conformacionales en la molécula. Estos cambios permitirían que una misma droga se pueda transferir de un sitio de unión a otro para, de esta forma, ser transportada hacia el exterior.

Aunque los sustratos típicos son hidrofóbicos, anfipáticos con pesos molecular superior a los 400 kDa y con carga positiva a pH 7.4, son otras muchas las moléculas que se unen a ella, siendo difícil hacer una propuesta sobre la estructura básica que deben poseer estos compuestos. En la siguiente figura se esquematiza el modelo de acción de P-gp, observándose como se suceden dos procesos de hidrólisis y como la presencia y degradación del ATP es necesaria para su correcto funcionamiento.



### 3.4. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE P-GLICOPROTEÍNA

La P-gp está estratégicamente distribuida en la superficie de células epiteliales de órganos relacionados con la absorción, distribución y excreción de drogas.

En ratones “knockout”, la modulación en la expresión de esta molécula afecta a los niveles de absorción de drogas a través del tracto intestinal (Chiou y cols., 2000), lo que puede ser importante en el desarrollo de terapias basadas en la administración de drogas orales. La P-gp también se distribuye en tejido nervioso, en donde existen evidencias de que modula activamente la distribución de sus sustratos incluyendo drogas (Lee y Bendayan, 2004). En placenta, esta molécula se sabe que interviene en la protección del feto disminuyendo los niveles de exposición a las drogas administradas a la madre (Ushigome y cols., 2000). Su expresión se extiende

también a testículo y a la membrana de los hepatocitos canaliculares y de los túbulos proximales del riñón. En estos dos últimos casos, interviene en el proceso de excreción de determinados tipos de toxinas (Iyer y cols., 2002). Comparando los niveles de ARN en algunos tejidos encontramos las siguientes diferencias de expresión:

ARNm	Tejido/Estructura	Tejido/Estructura	ARNm
1	Músculo	Hígado	25
1	Piel	Colon	31
20	Yeyuno	Riñón	51
20	Pulmón	Gl. Suprarrenal	160

### 3.5. EXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA EN CÁNCER

La relación entre la resistencia a drogas en cáncer y grado de expresión de P-gp/mdr1 ha sido analizada en numerosos estudios.

En las neoplasias hematológicas, el fenotipo MDR es fundamentalmente observado después del fallo en el tratamiento. En este tipo de neoplasias la RT-PCR es, con diferencia, la técnica más sensible para determinar la expresión del mRNA de mdr1. Otras técnicas, como el slot blot o la inmunocitoquímica (con anticuerpos como MRK16, C219 y JSB1), muestran diferencias en cuanto a la capacidad de detectar P-gp. En cualquier caso, la detección del fenotipo MDR y la posible reversión de este fenotipo son clínicamente muy importantes en estas malignidades hematológicas. Así, en la leucemia mieloide aguda (AML) existe una correlación inversa entre el nivel de expresión de P-gp y la respuesta clínica a la quimioterapia. Hoy sabemos que la causa del fallecimiento de la mayoría de los pacientes en los dos primeros años después del diagnóstico, está relacionada con dicha resistencia o con complicaciones derivadas del tratamiento (Wedding y cols., 2004). Podemos decir que en la AML, existe entre un 30 y un 50% de positividad para mdr1, siendo más frecuente encontrar dicha expresión

después del fracaso en el tratamiento con quimioterapia (Han y cols., 2000). No está claro si en estos casos se produce una selección de clones resistentes o una sobreexpresión de novo debido al uso de las drogas citotóxicas. Sin embargo, si está demostrado que P-gp es un marcador de pobre pronóstico, sobretodo porque la utilización de drogas que no son sustrato de esta proteína mejoran la evolución de los pacientes (Broxterman y cols., 2000). En la leucemia linfoblástica aguda (ALL) la sobreexpresión de *mdr 1* antes del tratamiento es menor del 10%, incrementándose significativamente en el estadio final de la enfermedad lo que se relaciona con el fallo en el tratamiento. No obstante, otros estudios contradicen estos resultados. Stam y cols. (2004) no encuentran un significativo aumento de expresión no sólo de P-gp sino tampoco de otras proteínas como MRP1, LRP y BCRP que parecen no ser determinantes en la resistencia en ALL. En la leucemia linfocítica crónica (CLL) predominan los estudios que encuentran una expresión de P-gp moderadamente elevada que, sin embargo, no se modifica después del tratamiento con quimioterapia. En el mieloma múltiple (MM) los resultados obtenidos son contradictorios existiendo desde una expresión de P-gp no significativa hasta la presencia de este fenotipo resistente en el 60% de los pacientes en el momento del diagnóstico. Por último, los estudios que relacionan resistencia y linfoma no Hodgkin (LNH) son retrospectivos, utilizando inmunohistoquímica de secciones congeladas. Los resultados, en general muy dispares, deben ser tomados con cautela debido a la mezcla de células de estroma, linfocitos reactivos y linfocitos tumorales en la muestra, lo que podrían llevar a obtener falsos positivos debido a la alta positividad de de las células de estroma y de los macrófagos activados.

En tumores sólidos, los estudios son más heterogéneos. Se observa una gran variación dependiendo del método de detección, aplicación de terapia previa y tipo y grado de tumor. El primer ejemplo de una correlación de la expresión de *mdr 1* con recaídas en carcinomas de tejidos blandos en

niños fue realizado por Chan y cols. (1990). La expresión de mdr 1 ha sido demostrada en tumores derivados de tejidos que expresan normalmente mdr 1 que, como ya vimos, incluye entre otros el hígado, el intestino o el riñón (Fromm y cols., 2002). Curiosamente, los tumores derivados de estos tejidos ofrecen más dificultades a la acción de la quimioterapia. (Cree y cols., 2002). La alta expresión de P-gp en tumores con esta localización primaria puede ser simplemente un reflejo del fenotipo normal y además puede estar relacionado con el estado de diferenciación de las células. No obstante, parece que incluso la presencia de un pequeño número de células resistentes (1-5%) representa un incremento en el riesgo de enfermedad, siendo por tanto relevantes para la respuesta al tratamiento.

En cuanto a tipos tumorales específicos, son muchas las series analizadas determinando la expresión de P-gp. En muchos casos, los resultados son contradictorios y hacen difícil obtener conclusiones. En cáncer de mama se ha detectado la presencia de P-gp hasta en un 41% de los pacientes, aumentando su expresión después de la quimioterapia (Trock y cols., 1997). Por otra parte, mdr1 ha sido detectado en un 25% de pacientes con cáncer de pulmón (Young y cols., 1999) mientras que los niveles suelen ser bajos en cáncer de ovario (Joly y cols., 2002). Algunos estudios han intentado valorar la expresión de P-gp en cáncer de vejiga. En uno de ellos se ha observado una casi nula expresión en tumores de bajo grado de evolución mientras que en grados más avanzados la positividad llega hasta el 27% (Clifford y cols., 1996). En estos tumores, la terapia provoca en general, un aumento en la expresión no sólo de P-gp sino también de otras moléculas relacionadas con la resistencia como MRP (Nakagawa y cols., 1997). En tumores de tejido nervioso, la presencia de P-gp en el endotelio de los capilares, donde parece contribuye a la eficacia de la barrera hematoencefálica, dificulta la interpretación de los resultados. Así, el endotelio de los neocapilares originados por el crecimiento del tumor llega a



expresar P-gp en el 80% de los casos mientras que tan sólo el 20% de los pacientes muestran positividad en el propio tumor (Toth y cols., 1996).

En relación a los RMS, ya Chan y cols. (1996) demostraron que la combinación de quimioterapia con agentes que revierten fenotipo MDR mejoran los resultados. Estos datos apuntaban hacia la importancia de la expresión de esta proteína en el mecanismo de resistencia de los tumores miogénicos. Hoy sabemos que la expresión de P-gp en células derivadas de RMS induce un fenómeno clásico de resistencia frente a diferentes fármacos (Prados y cols., 1996).

Pero además, la sobreexpresión de *mdr 1* provoca modulaciones en la expresión de determinados genes, algunos de los cuales se encuentran, como vimos, relacionados con el proceso de diferenciación miogénica. Entre ellos, la reducción en la expresión de *c-myc* provoca un proceso de diferenciación en estas células que induce la aparición de características más propias de células musculares maduras que de células con un elevado grado de indiferenciación (Prados y cols., 1998; 1999), lo que tiene importantes implicaciones desde el punto de vista del pronóstico, sobre todo con relación al desarrollo de metástasis.

En general, podemos decir que la expresión de *mdr 1* en el momento del diagnóstico de los tumores malignos posee un impacto ciertamente negativo en la duración de la remisión y en la supervivencia de los pacientes afectados de cáncer. El estudio de su expresión y de su mecanismo de aparición será necesario para mejorar la eficacia de los tratamientos.

### **3.6. REVERSIÓN DE RESISTENCIA MEDIADA POR P-GLICOPROTEÍNA**

La reversión farmacológica *in vitro* de MDR mediada por P-gp fue llevada a cabo en primer lugar por Tsuruo y cols. (1981), quienes

demonstraron que el verapamilo y el trifluoperazin incrementaban la acumulación de vincristina en una línea celular de leucemia murina resistente a drogas potenciando su actividad antiproliferativa. Este hecho fue de enorme relevancia clínica debido a la correlación manifiesta en muchos tumores entre la P-gp y el pronóstico tras el tratamiento con quimioterapia. A partir de esta primera experiencia, han sido numerosas las estrategias que se han diseñado para prevenir o revertir la resistencia y que se han basado en disminuir la expresión y/o inhibir la actividad funcional esta molécula.

Muchos agentes quimiosensibilizadores han sido descritos como capaces de revertir la resistencia a drogas: bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la calmodulina, agentes inmunosupresores, quinolinas, detergentes, esteroides y antiestrógenos. Unos (verapamilo, ciclosporina A, azidopina, diltiazem, FK-506) son sustratos transportados por P-gp, otros (progesterona, nitrendipina) revierten la resistencia por bloqueo de su enlace a drogas anticancerígenas (Ueda y cols., 1992; Saeki y cols., 1993).

#### Inhibidores de P-gp

<b>Bloqueadores de calcio y sodio</b>	<b>Esteroides y análogos</b>
Verapamilo, Azidopina, Quinidina, Primaquina, Amiodarona, Propafenona	Progesterona, Tamoxifeno, RU486
<b>Anatagonistas de calmodulina y análogos</b>	<b>Alcaloides indólicos, péptidos cíclicos y macrólidos</b>
Trifluoperazina, LY335979, GF120918, R101933	Yohimbina, Ciclosporina A, PSC-833, FK-506, Rapamicina
<b>Inhibidores de Protein-kinasa C</b>	<b>Otros</b>
Dexniguldipina, Estauosporina, Calfostina C	XR9576, Biricodar, OC144-093, Itraconazol, Ketoconazol, Dipiridamole

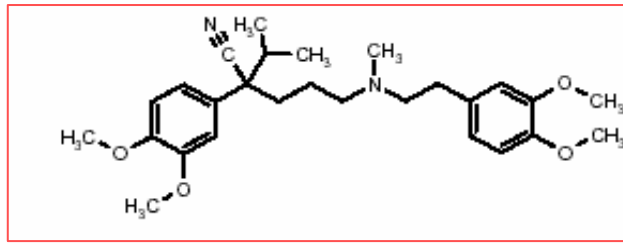
Entre los elementos básicos necesarios para la posible aplicación de una terapia basada en la reversión de la resistencia mediada por P-gp, se encuentra el conocimiento de los dominios proteicos que directamente se relacionan con el reconocimiento, enlace, transporte y liberación de las

drogas, o sea, los sitios de P-gp que realmente interactúan con la droga. Parece ser que son ambas mitades de la proteína las que contribuyen al enlace con la droga, siendo zonas de gran importancia, una región cercana o dentro del sexto dominio transmembrana en la mitad N-terminal y otra en posición análoga (cerca o dentro del dominio transmembrana 12) en la mitad carboxi-terminal. Complejos análisis mutacionales han determinado que son varios los residuos de aminoácidos clave que, estando presentes dentro de los dominios 5, 6, 11 y 12 transmembrana, cuando se alteran, cambian la especificidad de sustrato de la P-gp y que existen residuos de aminoácidos adicionales que se encuentran en otros segmentos de membrana o en las proximidades, y que juegan también un papel determinante en el patrón de “cross”-resistencia conferido por el transportador (German y cols., 1996).

La primera generación de agentes que revierten el fenotipo MDR despertó una gran expectación. No obstante, con muchos de ellos, no se obtuvieron resultados realmente aplicables debido a varias causas; no poder determinar el papel de la P-gp en la resistencia de los pacientes estudiados, no dilucidar los niveles de expresión en las muestras analizadas y, quizás, lo más importante, no poder traspasar los resultados obtenidos en estudios experimentales al campo de la actuación clínica, debido a que las dosis necesarias de estos agentes para lograr el efecto deseado presentaban graves problemas de toxicidad en los pacientes.

Una de los primeros casos de reversión clínica de resistencia se produjo en un paciente con mieloma tratado con VAD y verapamilo (Durie y Dalton, 1988). Este agente, el verapamilo, ha sido utilizado posteriormente a nivel experimental para analizar en cultivo los efectos de la supresión del fenotipo MDR. Sin embargo, en otros pacientes como aquellos afectados de mieloma múltiple y linfoma non-Hodgkin, el verapamilo a concentraciones plasmáticas efectivas provocó arritmias cardíacas. A este efecto indeseable

hay que añadir, el incremento en la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos en tejidos normales.



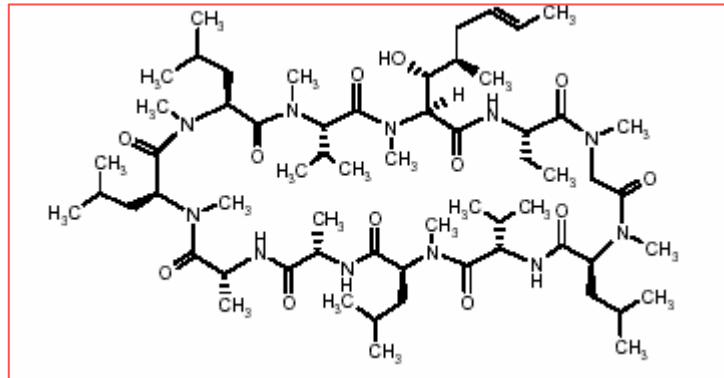
Estructura química de agente verapamilo, utilizado para revertir la resistencia mediada por P-gp

Además, muchos moduladores alteran la farmacocinética de las drogas relacionadas con MDR a través de la modulación de P-gp en los canalículos biliares y en los túbulos renales (bloqueo biliar y eliminación renal de las drogas). Estos efectos conducían a un incremento en la toxicidad, como se pudo demostrar, por ejemplo, en la mayoría de estudios clínicos que empleaban verapamilo o ciclosporina A con VAD. Consecuentemente, las dosis de drogas cuando son combinados con moduladores de MDR debieron ser reducidas para evitar la intensificación de su efecto tóxico

Sucesivos estudios han ido salvando estas primeras dificultades encontradas en el uso de los moduladores de resistencia. Un ensayo en fase I en pacientes con linfoma o sarcoma refractario permitió alcanzar concentraciones en plasma seguras y efectivas de dexverapamilo y nordexverapamilo. Su combinación con EPOCH (etopósido, doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida y prednisona) consiguió una respuesta en la mitad de los pacientes mdr 1 positivos (Wilson y cols., 1995). En cuanto a la ciclosporina, usada junto a VAD en pacientes con mieloma avanzado, se consiguió una respuesta eficaz en algunos estudios (58%).

Una segunda generación de agentes que revierten el fenotipo MDR fue desarrollada con el objetivo de mejorar los resultados de los compuestos

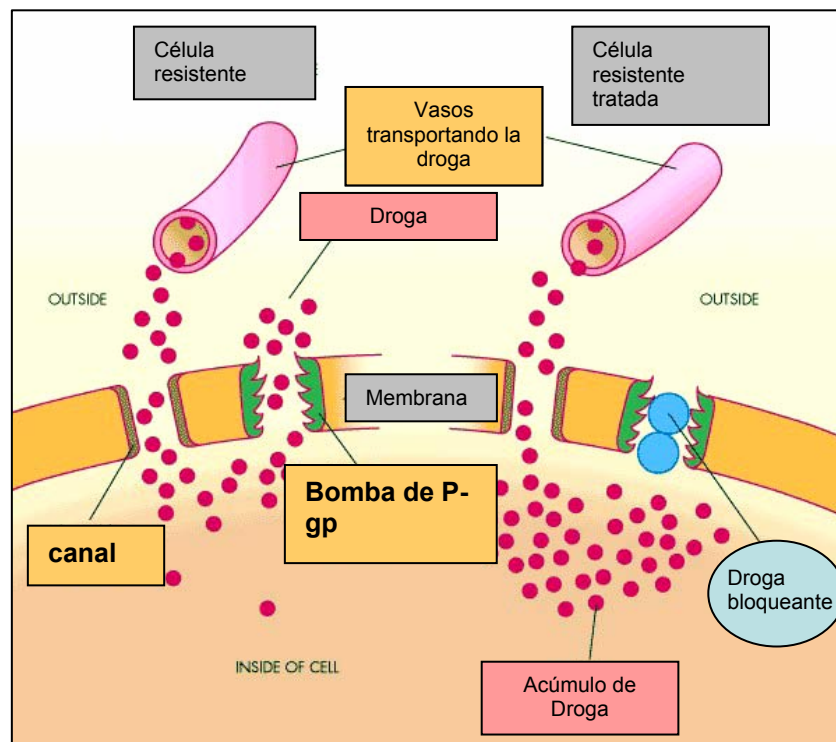
inicialmente utilizados y evitar sus efectos secundarios. Uno de los más ampliamente testado fue PSC 833 (valsopodar), un derivado de la ciclosporina D, que resulta ser 10 veces más potente que la ciclosporina A, pudiendo ser usado a dosis menores (Bates y cols., 2002).



Estructura química de agente ciclosporina, utilizado para revertir la resistencia mediada por P-gp.

En cáncer de ovario, la combinación de PSC 833 y paclitaxel mejoró la respuesta en un 8.6% de los pacientes que en principio no respondían al tratamiento (Fracasso y cols., 2001). Por otra parte, ensayos en fase III, en los que se combina el PSC 833 con paclitaxel y carboplatino, en este mismo tipo de pacientes, demuestran buenos resultados (Joly y cols., 2002). Otro agente, VX-710 (biricodar), actúa con un mayor espectro, siendo capaz de restaurar la sensibilidad a drogas tanto en la resistencia mediada por *mdr 1* como por *MRP1*. En experiencias con pacientes con cáncer de mama en estadio metastático refractario al tratamiento convencional, la respuesta fue aceptable (un 11% de los pacientes) cuando se utilizó la combinación de este agente con paclitaxel (Toppmeyer y cols., 2002). Además, la dosis de este segundo agente se redujo hasta en un 54%. Sin embargo, esta ventaja no siempre es obtenida, como es el caso de algunos tipos de sarcomas en los que a pesar de una asociación (doxorubicina y VX-710) la dosis de la primera droga no pudo ser reducida (Bramwell y cols., 2002). Otro ejemplo del uso de los bloqueadores de MDR es en la AML, en la cual, experiencias

recientes ofrecen resultados alentadores. List y cols. (2001) observan que la combinación de citarabina y daunorrubicina asociada a ciclosporina conduce a mejores resultados que los obtenidos sin el uso de este agente que revierte la resistencia. Los pacientes que mostraron una mejor respuesta fueron aquellos que presentaban elevados niveles de P-gp. Estudios similares, usando PSC833, citarabina, doxorubicina y etopósido mostraron también beneficios en los pacientes con expresión de P-gp (Baer y cols., 2002).



Representación esquemática de la acción de un agente bloqueante de P-gp en el tratamiento de una célula tumoral con fenotipo resistente

Estos estudios recalcan que para la aplicación de estos agentes debe realizarse una selección adecuada de los grupos de pacientes. Esto incluye, la selección de la patología, de la combinación terapéutica y del diseño del ensayo. En las patologías donde P-gp es el mecanismo inicial de resistencia, como es el caso de los RMS, es donde deben realizarse los mayores

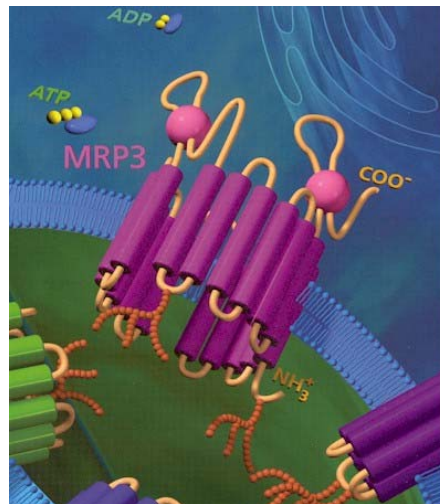
esfuerzos. se deben realizar esfuerzos para usar regimenes terapéuticos que incluyan sustratos inhibidores de P-gp.

Por otra parte, en tumores quimiosensibles los agentes que revierten resistencia pueden prevenir la aparición de clones con este fenotipo. Estudios experimentales en sarcomas usando PSC 833 demuestran una reducción de diez veces en la producción de mutaciones que provocan resistencia a la doxorubicina. En RMS parecen prevenir la aparición de resistencia a vincristina (Cocker y cols., 2001). No obstante, la resistencia puede ahora aparecer por otros mecanismos como por una reducción en la expresión de topoisomerasa II (Beketic-Oreskovic y cols., 1995). Una última generación de inhibidores de P-gp incluyen los agentes tariquidar (XR9576) zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933) y ONT-093, que, aunque con diferentes estructuras, poseen gran especificidad por esta molécula y están siendo usados en ensayos clínicos (Thomas y Coley, 2003).

#### **4. OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA A DROGAS EN CÁNCER**

##### **4.1. LAS PROTEÍNAS MRP Y LRP**

El descubrimiento de **MRP** se realizó en la línea H69AR seleccionada con adriamicina (línea de cáncer de células pequeñas de pulmón H69) (Mirski y cols., 1987). Su transfección en células HeLa confiere resistencia a agentes quimioterapéuticos (Grant y cols., 1994). Con un mRNA de 6.5 Kb, MRP es una proteína de 1531 aminoácidos (peso molecular de 190 kDa) (Cole y cols., 1992) que difiere tan sólo en el 15% de los aminoácidos con P-gp. Ambas confieren resistencia a un conjunto similar de agentes quimioterapéuticos (Hasegawa y cols., 1995). Como en el caso de P-gp, MRP pertenece a la superfamilia ABC de transportadores y contiene una región transmembrana hidrofóbica y un dominio que enlaza a nucleótidos citoplasmáticos (NBD), preferentemente a ATP (Kuwanoy cols., 1999).



Posible estructura tridimensional de MRP (MRP3)

El gen MRP ha sido mapeado en el cromosoma 16 (Slovak y col., 1993). En la actualidad, se conoce bastante poco sobre los procesos que regulan la transcripción del gen MRP, aunque se han observado en su secuencia sitios potenciales de unión a factores como el Sp1, que pueden controlar los niveles basales del gen o la modulación de su actividad en respuesta a una variedad de estímulos (Loe y cols., 1996).

MRP es expresado en bajos niveles en muchos tejidos, incluyendo testículo, músculo esquelético, corazón, riñón, pulmón y células hematopoyéticas. También es detectable en cerebro, bazo, hígado e intestino. No obstante, las funciones fisiológicas de MRP en estos tejidos no se conocen con claridad. Así, se ha postulado que esta proteína podría estar relacionada con una función detoxificadora y como transportador de esteroides glucoronoides, de derivados de sales biliares y de sustratos aniónicos hidrofóbicos, además de estar involucrado en la regulación de canales endógenos (Keppler y cols., 1999).

En tumores, MRP confiere resistencia a drogas por un mecanismo similar al de P-gp. No obstante, existen algunas diferencias en cuanto a la resistencia cruzada que provoca (Cole y cols., 1994) y a su distribución



subcelular que parece predominar en el retículo endoplásmico en unas células (Krishnamachary y cols., 1993) y en la membrana plasmática o en las vesículas post-Golgi en otras (Almquist y cols., 1995). Esta proteína aparece en una gran variedad de tipos tumorales, incluyendo leucemias, fibrosarcomas, cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de mama, de cervix, de próstata y carcinomas de vejiga. Sin embargo, los datos obtenidos deben interpretarse con precaución debido a la heterogeneidad de las muestras analizadas y a que la cantidad de la proteína MRP funcional puede no estar del todo correlacionada con los niveles de mRNA (Chan y cols., 1995). De hecho, altos niveles de mRNA de MRP han sido detectados en leucemias, en donde parece demostrado, no se correlacionan con la supervivencia del paciente ni con la respuesta al tratamiento (Van der Heuvel y cols., 2000). Mucho menos se conoce sobre la expresión de MRP en tumores sólidos. Estudios preliminares indican que los niveles de mRNA de MRP son elevados en neuroblastomas (Bordow y cols., 1994) en donde se ha observado una correlación con la amplificación de N-myc, lo que sugiere una relación entre los procesos celulares involucrados en la progresión tumoral y aquellos involucrados en la resistencia a agentes quimioterápicos.

Aunque muchos estudios han analizado drogas que revierten la resistencia mediada por P-glicoproteína, poco se sabe de la reversión de la resistencia asociada a MRP. Estudios llevados a cabo en células transfectadas con MRP han demostrado que los tratamientos con verapamilo o ciclosporina A no inhiben específicamente la acción del MRP (Cole y cols., 1994). Esto no es sorprendente si tenemos en cuenta la diferente especificidad de sustrato exhibida por los dos transportadores. La capacidad de vesículas con membranas enriquecidas con MRP para transportar cisteil-leucotrienos ha conducido a sugerir que los compuestos que alteran los niveles celulares de GSH pueden modular la resistencia asociada a MRP. El agente más comúnmente utilizado experimentalmente para agotar el GSH en cultivos de células es la butionina sulfoxidoamina (BSO).

Una proteína de 110 kDa denominada proteína relacionada con resistencia en pulmón (**LRP**) es la más importante proteína de “bóveda” relacionada con resistencia a drogas (Scheper y cols., 1993). Fue descrita en la línea 2R120 de cáncer de pulmón, obtenida de SW1573 por exposición a doxorubicina (Cole y cols., 1992). El gen que la codifica ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 16, muy cerca del gen MRP. Se encuentra sobreexpresado normalmente en las líneas celulares MDR negativas para P-gp, aunque en algunas líneas de cáncer de mama (MCF7/D40) y de melanoma (8226) se co-expresan. Por el contrario, se ha demostrado una frecuente asociación entre la expresión de LRP y MRP, principalmente cuando existen niveles bajos o moderados de resistencia a drogas (Slovak y cols., 1993).

A pesar de la demostrada asociación entre LRP y resistencia a drogas, diferentes estudios realizados en cultivos celulares de diferentes líneas tumorales, han demostrado claramente la ineficacia de esta por si sola para conferir resistencia. Estudios con daunomicina en células resistentes con expresión de LRP demuestran una distribución intracelular de las drogas hacia la región perinuclear que posteriormente se redistribuyen desde el núcleo hacia el citoplasma (Gervasoni y cols., 1991). Las estructuras que median esta redistribución son desconocidas aunque se ha propuesto a las “bóvedas” como mediadores de la resistencia regulando la redistribución citoplasmática y el transporte nucleocitoplasmático de las drogas.

Al igual que P-gp y MRP, LRP se presenta ampliamente distribuida en los tejidos normales del tipo epitelio bronquial, tracto digestivo, queranocitos, corteza adrenal, macrófagos, túbulo proximales del riñón, uroepitelio de transición, páncreas y en células germinales. Niveles oscilantes han sido encontrados en otros órganos, incluyendo trofoblastos y células de Purkinje (Izquierdo y cols., 1996). La presencia de LRP en distintos tipos celulares, sugiere que las “bóvedas” tienen una función básica común en todas ellas,

aunque tampoco pueden ser excluidos funciones específicas de cada tipo celular.

La importancia clínica de LRP como mecanismo de resistencia es muy discutida. Los estudios de Wu y cols. (1992) detectan LRP en el 78% de las líneas de cáncer no seleccionadas con drogas que fueron analizadas (incluyendo cáncer de colon, riñón, pulmón, mama, ovarios, cerebro, melanomas y leucemias). En este mismo estudio el 87% expresaban MRP y tan sólo el 24% expresaban P-gp. Fueron los tumores que presentan una típica pobre respuesta a la quimioterapia (cáncer de colon y riñón) las que mostraron más altos niveles de expresión de LRP. En contraste, células derivadas de leucemia mostraron bajos niveles de LRP.

Por otra parte, Cordon-Cardo y cols. (1990) encuentran expresión de LRP en el 63% de los 174 tumores analizados (incluyendo 27 tipos tumorales). Los tumores con menor expresión de LRP fueron los de tipo germinal, tumor de Wilms, RMS, sarcoma de Ewing y leucemia mieloide aguda. Tres de cuatro especímenes de células pequeñas de cáncer de pulmón y una significativa proporción de carcinomas de ovario fueron negativos. No obstante, en el cáncer de pulmón se está aún lejos de explicar el complejo fenómeno de resistencia observado en diferentes experiencias (Scagliotti y cols., 1999). La mayoría del resto de tumores sólidos fueron predominantemente positivos. La distribución de LRP en los especímenes clínicos fue consistente con los datos in vitro que indicaban una amplia distribución de mecanismos asociados con LRP y reflejaban la respuesta de diferentes tipos tumorales a la quimioterapia (Izquierdo y cols., 1996).

#### **4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA “NO CLÁSICA”**

En la denominada resistencia multidrogas “no clásica” se incluyen mecanismos no basados en transportadores entre los que se encuentran alteraciones en la actividad de sistemas enzimáticos específicos como el de la

glutation-S-transferasa o el de las topoisomerasas, que disminuyen la actividad citotóxica de la droga independientemente de su concentración intracelular, o bien puede ser causada por cambios en el equilibrio de proteínas que controlan la apoptosis puesto que la mayoría de las drogas anticancerígenas ejercen su función citotóxica activando el proceso de muerte celular programada (Krishna y Mayer, 2000).

#### **4.2.1. Glutation-S-transferasa como inductor de resistencia a drogas**

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas que actúan en los procesos de detoxificación celular y forman parte del sistema conjugación/oxidación que metaboliza agentes citotóxicos y otros compuestos como las drogas anticancerígenas (MacLellan y Wolf, 1999). Compuestas por dos grandes familias (Townsend y Tew, 2003), intervienen en el metabolismo endógeno de leucotrienos y prostaglandinas (microsomales) y en la conjugación del GSH reducido (citosólicas) (Townsend y Tew, 2003). La combinación de GSH con drogas anticancerígenas conduce a la formación de conjugados menos tóxicos y más solubles en agua que generalmente son inactivos y pueden ser excretados a través de la orina o de la bilis (Bredel, 2001). Por tanto, su sobreexpresión en una célula tumoral, la protege de la acción de los citotóxicos.

Ha sido relevante el descubrimiento de la asociación entre este mecanismo de resistencia y la proteína asociada a la resistencia a multidrogas MRP, dado que esta última, actúa como una bomba de eflujo de conjugados del glutatión. Este hecho fue rotundamente demostrado por Gomi y cols., (1997) quienes demostraron que el incremento de MRP estaba acompañado de incrementos en GSH como un auténtico sistema quimioprotector combinado en células de glioma y también por Müller y cols. (1994) quienes tras transfectar MRP observaron un drástico incremento del transporte de conjugados del glutatión.

Existen evidencias que demuestran que células derivadas de tumores humanos resistentes a drogas anticancerígenas, particularmente a agentes alquilantes y compuestos de platino, presentan incrementos de los niveles de GSH y una mayor actividad de la GST (Tew, K.D., 1994). Sin embargo, los datos obtenidos en pacientes con cáncer son bastante contradictorios. Este autor ha observado elevada expresión de GSH en muestras de tejido de cáncer de pulmón de células pequeñas y en carcinoma de cabeza y cuello, lo que también ha sido detectado el carcinoma de ovario (Sprem y cols., 2001). En otros tipos de tumores como los de estómago y colon los resultados no son tan evidentes (Ferruzzi y cols., 2003).

El sistema de detoxificación GST/GSH parece ser de gran importancia en el fenotipo de resistencia a drogas frente a cloroetilnitrosoureas (CENUs), compuestos de platinum y un gran número de CENU-compuestos alquilantes incluyendo melfalan, ciclofosfamida, clorambucil y mostaza nitrogenada (Chen y Waxman, 1994). Las evidencias más poderosas de esta acción se han obtenido mediante experimentos de transfección en células de ovario de Hamster Chinese (CHO) que mostraron resistencia a cisplatino y carboplatino (Miyazaki y cols., 1990).

Por último, algunos moduladores de los niveles de GSH y GST, (butionina sulfoximina o BSO) han permitido demostrar que una disminución de GSH sensibiliza a las células frente a las drogas (Fruehauf y cols., 1998). Resultados parecidos fueron obtenidos con la sulfasalazina en cáncer de pulmón (Awasthi y cols., 1994) y ovario (Gupta y cols., 1995), con aumentos de sensibilidad a cisplatino y melfalan respectivamente.

#### **4.2.2. Topoisomerasas como mecanismo de resistencia**

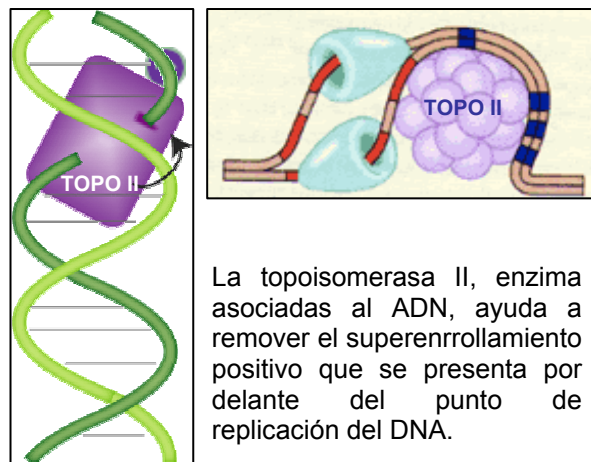
La topoisomerasa es una enzima nuclear que actúa sobre el superenrollamiento negativo del ADN, proceso vital para la replicación, recombinación y transcripción del ADN nuclear. Se han descrito dos isoformas

de la topoisomerasa II (alfa y beta) que poseen un peso molecular de 170 y 180 kDa respectivamente (Roca, 1994) y cuyos genes se localizan en los cromosomas 17q y 3p respectivamente. La topoisomerasa alfa actúa generando rupturas en la doble cadena de ADN y la beta es un componente integral de la matriz del nucleolo y del núcleo (Danks y cols., 1994). En células malignas la proporción relativa de topoisomerasa II alfa y beta se encuentra incrementada y su vida media es mayor en comparación con las células no neoplásicas (Woessner y cols., 1990).

La topoisomerasa II ha sido asociada con una forma especial de resistencia a multidroga que se ha denominado atípica (at-MDR) (Nitiss y Beck, 1996). Sabemos que en células tumorales, elevados niveles de topoisomerasa II confieren sensibilidad a drogas, mientras que bajos niveles están asociados a resistencia (Lynch y cols., 1997). Un caso particular son los tumores cerebrales en donde los datos no son concluyentes (Montaudon y cols., 1997). Los estudios realizados por Taki y cols. (1998) en gliomas indican que probablemente sea más la alteración en la localización y la actividad que en la expresión de la topoisomerasa la causa de resistencia. Estos autores sugieren que alteraciones de la unión de la topoisomerasa con el ADN pueden ser las bases moleculares de este mecanismo de resistencia a drogas y que las células de glioma pueden adquirir la resistencia por una reducción en la actividad catalítica de la topoisomerasa y por un incremento de la expresión de topoisomerasa II. En contraste, Matsumoto y cols., (1999) han observado que las células resistentes de glioblastoma frente a etopósido presentan una disminución de los niveles de ARNm y proteína de topoisomerasa II acompañados de una disminución de la actividad enzimática.

Por último, este mecanismo de resistencia parece estar asociado al pronóstico en pacientes con cáncer. Tal es el caso de los astrocitoma (Taniguchi y cols., 1999) en donde bajos índices de expresión de topoisomerasa II se correlacionan con un mayor tiempo de supervivencia. No

obstante, muy poco se sabe aún en relación a este aspecto en otro tipo de tumores.



#### 4.2.3. Resistencia y fenómeno apoptótico

Las diferentes estrategias utilizadas en el tratamiento del cáncer, entre las que se encuentran la utilización de drogas anticancerígenas, radioterapia, genes suicidas o inmunoterapia, están destinadas a eliminar las células tumorales a través de la inducción de apoptosis (Herr y Debatin, 2001; Kaufmann y Earnshaw, 2000; Kaufmann y Gores, 2000; Lowe y Lin, 2000). La apoptosis es un programa de muerte celular intrínseco de la célula que ocurre en varias situaciones fisiológicas y patológicas (Hengartner, 2000). El mecanismo que subyace en el inicio de esta respuesta ante una terapia con citotóxicos varía dependiendo de los diferentes estímulos y todavía se desconocen muchos aspectos del mismo. Sin embargo, el daño en el ADN o en estructuras subcelulares parece ser un punto inicial común para algunos inductores. De hecho, la apoptosis provoca modificaciones morfológicas y bioquímicas en las células, entre las que se incluyen la fragmentación del ADN nuclear o alteraciones de membrana (Hengartner, 2000).

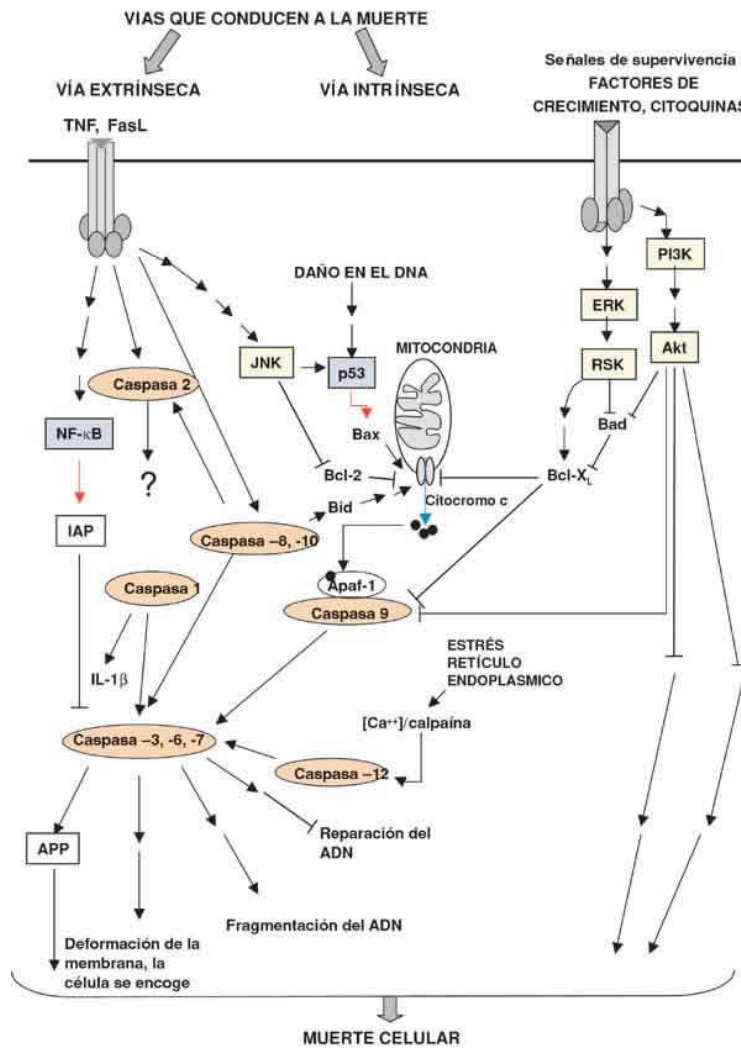
La mayoría de las terapias anticancerígenas tienen como consecuencia la activación de las caspasas, una familia de cistein-proteasas que actúan

como moléculas efectoras de muerte celular (Degterev y cols, 2003). Se clasifican actualmente como iniciadoras y efectoras. Las primeras están directamente ligadas a complejos de señalización que inducen muerte, mientras que las segundas se adhieren a diferentes sustratos nucleares o citoplasmáticos responsabilizándose de muchas de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis (Earnshaw y cols., 1999).

La apoptosis, en respuesta a la terapia del cáncer, se produce a través de la activación una maquinaria que incluye el receptor y la ruta de señalización mitocondrial (Herr y Debating, 2001). La relativa contribución de ambas rutas están siendo ampliamente discutidas y según estudios recientes se potencia más la hipótesis de unión y convergencia de las rutas extrínsecas (receptor) e intrínsecas (mitocondrial) que la de la separación entre ambas rutas (Debatin y cols., 2004; Gross y cols., 1999; Haupt y cols., 2003)

La ruta extrínseca involucra a los receptores de muerte que pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y, a través de la formación de complejos de señalización que inducen muerte (DISC), conducen a la activación de las caspasas, incluyendo a la caspasa 8 y 3, que a su vez inducen la apoptosis. Los receptores de muerte son miembros de una superfamilia de genes receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que consta de más de 20 proteínas y que actúan regulando la muerte y la supervivencia celular, la diferenciación o regulación inmune (Ashkenazi y Dixit, 1998, 1999; Walczak y Krammer, 2000). Los miembros de esta familia presentan un dominio extracelular y un dominio citoplasmático de unos 80 aminoácidos (“dominio de muerte”) que transmite la señal de muerte desde la superficie de la célula hasta la ruta de señalización intracelular. Los receptores de muerte mejor caracterizados comprenden al CD95 (APO-1/fas), receptor 1 de TNF (TNFR1), TRAIL-R1 y TRAIL-R2. Los ligandos correspondientes de la superfamilia TNF comprende al ligando CD95, TNF, linfoquinas, TRAIL y TWEAK (Ashkenazi y Dixit, 1998, 1999; Walczak y Krammer, 2000).





La ruta intrínseca se activa en respuesta al daño en el DNA y está asociada con despolarización mitocondrial y liberación de citocromo C desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citoplasma. Citocromo C, Apaf-1 y procaspasa 9, forman un complejo denominado apoptosoma, en el cual se activa la caspasa 9 que promueve la activación de la caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7 (Nicholson y Thornberry, 2003; Van Loo y cols., 2002).

Dado que muchas estrategias quimioterapéuticas frente al cáncer ejercen su efecto antitumoral activando la apoptosis, puede que su alteración tenga como consecuencia la aparición de resistencia (Fulda y Debatin, 2004). Este mecanismo puede activarse ya sea por pérdida de genes necesarios en

la activación del programa de muerte celular o por la sobreexpresión de genes que bloquean dicho proceso (Krishna y Mayer, 2000).

Una de las familias de genes relacionadas con el control de la ruta de apoptosis intrínseca es la familia de proteínas Bcl-2, la cual regulan la liberación de citocromo C desde la mitocondria (Kuwana y cols., 2002). Esta familia incluye miembros anti-apoptosis como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, y moléculas pro-apoptosis como Bax, Bak, Bad, Bid, Noxa y PUMA/bbc3. Los desequilibrios en la proporción de proteínas Bcl-2 anti y pro-apoptosis pueden inclinar la balanza a favor de la supervivencia frente a la muerte de las células tumorales. Además, Bcl-2 puede cooperar con oncogenes como c-myc en el proceso de carcinogénesis bloqueando la apoptosis inducida por este gen (Evan y Vousden, 2001). La resistencia inducida por las modificaciones de Bcl-2 implica a un gran número de agentes antineoplásicos (doxorubicina, taxol, etopósido, mitoxantrona y cisplatino) (Reed, 1995).

El gen supresor p53, además de activar rutas para restringir el crecimiento celular en respuesta a daño en DNA, activar oncogenes y parar el ciclo celular (en fase G1 y/o G2) puede inducir apoptosis (Jin y Levine, 2001). mediante la inducción de genes que codifican tres proteínas transmembrana: Fas, DR-5 y PERP (Muller y cols., 1998; Ashkenazi y Dixit, 1998; Burns y cols., 2001; Attardi y cols., 2000).

Sabemos que p53 se encuentra mutado en más del 60% de tumores (Levine y cols., 1997). En contraste con otros genes supresores en los que las mutaciones producen una pérdida funcional completa, parece que la mutación de p53 ofrece una ventaja selectiva a las células tumorales. Puesto que la inducción de p53 funcional puede conducir a apoptosis tras daño en el DNA, incluyendo el producido por agentes quimioterapéuticos, la adquisición de mutaciones u otros mecanismos de inactivación pueden producir carcinogénesis y quimiorresistencia (Tweddle y cols., 2003). No se puede establecer una correlación absoluta entre estado funcional de p53 y respuesta

al tratamiento, aunque estudios recientes llevados a cabo en neuroblastoma (Gangopadhyay y cols., 2002; Keshelava y cols., 2001) demuestran que la inactivación de p53 puede ser el mayor mecanismo de resistencia a drogas identificado en líneas celulares de este tipo de tumor (Tweddle y cols., 2003).

## **5. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y CÁNCER**

El tejido muscular esquelético diferenciado expresa débilmente antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Sin embargo, el proceso de desdiferenciación que supone la evolución de una célula muscular hacia su variante tumoral parece que induce modificaciones en la expresión de estos antígenos. Estudios realizados en RMS embrionarios, pleomórficos y alveolares han determinado variaciones en la expresión fundamentalmente de HLA de clase I (Fernández y cols., 1991). Estas modificaciones son paralelas a la modulación del grado de diferenciación que poseen las células como han revelado los estudios realizados mediante el marcador de diferenciación desmina. No obstante, no se conocen las implicaciones biológicas y/o clínicas de este hecho. Dado que la expresión de MHC en células tumorales se relaciona con la agresividad tumoral y debido a la posibilidad de utilizar una terapia de inmunomodulación en algunos tipos de tumores, el estudio de la expresión de estos antígenos en RMS puede ser de gran utilidad en la determinación de su pronóstico y en el posible desarrollo de nuevas terapias (Shoshan y Admón., 2004).

### **5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MHC**

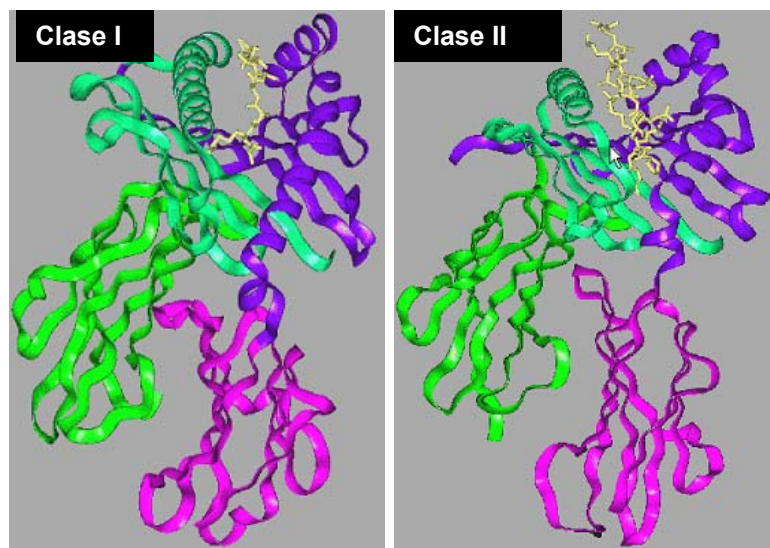
El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), descubierto por su implicación en el rechazo o aceptación de transplantes o injertos de tejidos u órganos, intervienen en el desarrollo de las respuestas inmunes específicas humoral y celular. Se trata de un conjunto de genes localizados en el cromosoma 6 (región HLA) que determina tres tipos de moléculas: genes de clase I (MHC-I) que codifican glucoproteínas de membrana

implicadas en la presentación de antígenos peptídicos de células propias alteradas a los linfocitos T citotóxicos, genes de clase II (MHC-II) que codifican glucoproteínas de membrana de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B) actuando como presentadoras de antígenos peptídicos a linfocitos T colaboradores y genes de clase III (MHC-III) que incluyen genes como los de proteínas del complemento y el del factor de necrosis tumoral (TNF) (Paul, 1999).

Complejo HLA							
Clase MHC	MHC-II			MHC-III	MHC-I		
Región	<i>DP</i>	<i>DQ</i>	<i>DR</i>	C4, C2, BF, etc.	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>A</i>
Productos génicos	<i>DP</i> ( $\alpha\beta$ )	<i>DQ</i> ( $\alpha\beta$ )	<i>DR</i> ( $\alpha\beta$ )	proteínas del complemento, $TNF\alpha$ , $TNF\beta$	<i>HLA-B</i>	<i>HLA-C</i>	<i>HLA-A</i>
Ubicación	<hacia centrómero			brazo corto cromosoma 6	>hacia telómero >		

Estructuralmente, las moléculas de clase I constan de una cadena larga (alpha), una glucoproteína de unos 45 kDa codificada por los loci de tipo I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) y una cadena corta beta 2-microglobulina, de 12 kDa, constante y codificada por un gen que no forma parte del complejo MHC. La hendidura que estas moléculas presentan en su forma tridimensional está ocupada por péptidos que proceden de la degradación que acontece en citoplasma de la propia célula. Cuando se produce un proceso infeccioso o la célula se transforma en tumoral algunos de los péptidos que estaban unidos a MHC-I son desplazados por péptidos procedentes de procesamiento endógeno de las proteínas alteradas. Las moléculas de clase I aparecen en todas las células somáticas nucleadas,

aunque en cantidades diversas según los tipos celulares. Así, son muy abundantes en los linfocitos, menos abundantes en hígado, riñón y pulmones, y prácticamente no se detectan en cerebro y músculo esquelético. En la placenta no existen. Cada célula nucleada expresa en su superficie varios tipos de moléculas MHC de clase I, y cada uno de ellos (de los numerosos alelos posibles) se une a una gama de péptidos propios procedentes de procesamiento citosólico de proteínas normales de la propia célula (Janeway y Travers, 1994). Las moléculas MHC de clase II, aparecen en las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) y presentan péptidos procesados (de antígenos exógenos) a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Son también glucoproteínas unidas a membrana con dos cadenas (alpha, 33KDa y beta, 28KDa) asociadas covalentemente. Ambas poseen un segmento transmembrana y una cola intracitoplásmica. Los dominios alejados de la superficie celular se unen a péptidos derivados de procesamiento intracelular. Las moléculas de clase II aparecen en células que funcionan o pueden funcionar como presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans de la piel, células B maduras y células T activadas) (Janeway y Travers, 1994).



Estructura tridimensional de las moléculas HLA de clase I y HLA de clase II.

## **5.2. INMUNOLOGÍA Y CÁNCER**

Sabemos que la interacción de factores génicos y estímulos ambientales puede provocar alteraciones en el interior de las células que las conduce hacia una proliferación anormal. Una de las barreras frente a este proceso es el sistema inmune que, mediante diversos mecanismos, reconoce y elimina las células transformadas. Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal.

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue ya propuesto por Thomas y Burnet en 1957. La denominada teoría de la "vigilancia inmunológica" implica que las células malignas que se generan en nuestro organismo son detectadas y eliminadas por el sistema inmune (Grossman y Herberman, 1986). Sin embargo, diferentes sistemas de evasión desarrollados por estas células permiten su crecimiento de forma eficiente.

### **5.2.1. Mecanismos de escape tumoral**

Cuando el sistema inmune actúa contra la célula tumoral requiere que:

- a) los determinantes antigénicos sean expresados por las células tumorales,
- b) los antígenos sean eficientemente presentados por las moléculas a las que se unen,
- c) el reconocimiento de estos antígenos estimule la respuesta de los linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B y macrófagos y,
- d) que las células efectoras sean capaces de llegar al sitio de localización del tumor y causar la destrucción del mismo.

Para que los primeros pasos puedan realizarse, es necesaria la participación de varios tipos de moléculas, como son las del MHC, el receptor para antígenos de célula T (RcT), las moléculas de adhesión y los antígenos tumorales.

A pesar de que el sistema inmune es altamente eficiente en su respuesta contra el cáncer, existen mecanismos generados por los propios tumores que les permiten evadir dicha respuesta y desarrollarse en el organismo. Dichos mecanismos son muy variables y sólo en parte conocidos (Kawakami y cols., 2004; Shen y cols., 2005; Mercer y Mastro., 2005; Ikenuchi y cols., 2004; Mocellin y cols., 2005; Al-Rawi y cols., 2005). Entre ellos debemos destacar:

- Pérdida de la expresión de MHC para evitar el reconocimiento por los linfocitos T.
- Disminución o pérdida en el tumor de la expresión de antígenos asociados al tumor.
- Disminución o pérdida de la expresión de moléculas coestimuladoras en el tumor o en las células dendríticas, requeridas para una eficiente interacción con los linfocitos T.
- Neutralización de la respuesta inmune a través de la inducción de fenómenos de alergia o debido a la eliminación clonal de los linfocitos T específicos.
- Activación, generalmente mediada por el tumor, de células supresoras o células del sistema inmune que provoquen la secreción de citoquinas inhibitorias.
- Cambios, inducidos por el tumor, en las moléculas transductoras de señales en los linfocitos T.
- Utilización de factores estimulantes, que favorecen el crecimiento tumoral, producidos después de la activación del sistema inmune (TGF- $\beta$ ).

- Secreción de factores inmunosupresivos por los tumores (prostaglandina E<sub>2</sub> y IL-10).

Como vemos, una de las posibilidades de escape de la célula tumoral es la modificación en la expresión de los antígenos HLA. Como ya dijimos, la mayoría de los péptidos asociados al MHC clase I derivan de proteínas procesadas que proceden de las propias estructuras intracelulares o de microorganismos infecciosos. Estas proteínas son cortadas en segmentos polipeptídicos por los proteosomas y transportadas hacia el retículo endoplasmático por las proteínas dependientes de ATP llamadas TAP (transportadoras asociadas al procesamiento antigénico) hasta asociarse al MHC y ser presentadas en la superficie celular a los linfocitos T.

Cualquier defecto en el funcionamiento de los componentes del procesamiento y presentación antigénica incide en la capacidad de los linfocitos T de reconocer a la célula presentadora, en este caso la célula tumoral (Cromme y cols., 1994; Seliger y cols., 1996). Hoy sabemos que la pérdida de uno o varios alelos de HLA es un evento común en varios tipos de tumores, especialmente en las metástasis (Seliger y cols., 1997)

### **5.2.2. Cáncer e inmunoterapia**

Para que una inmunoterapia contra el cáncer sea eficaz, deben tomarse en cuenta la inmunogenicidad del tumor; el tamaño y la localización del mismo; su heterogeneidad, el estado inmunológico del paciente y los mecanismos de escape a la respuesta inmune. El interés por este tipo de terapia lo demuestran los numerosos estudios que intentan determinar estrategias inmunológicas para abordar una gran variedad de patologías tumorales (Li G y cols., 2005; Santin y cols., 2005; Saleh y cols., 2005; Hussain y Heimberger, 2005).



Han sido muchos los intentos de aplicar protocolos de inmunoterapia en cáncer. En modelos murinos, la inmunización con tejidos tumorales evita el crecimiento o provoca el rechazo. En estudios clínicos, la aplicación de este tipo de inmunoterapia en pacientes con melanoma, carcinoma de colon y cáncer de pulmón, ha dado resultados contradictorios (Blankenstein y cols., 1991). Otras, han sido la utilización de inmunización activa con antígenos tumorales, antígenos virales y anticuerpos monoclonales o la estimulación inespecífica del sistema inmune con compuestos de bacterias y liofilizados de toxinas bacterianas con resultados poco satisfactorios (Israel, 1993; Kedar y Klein, 1992)

Hoy, está cobrando gran fuerza la aplicación de citocinas, moléculas solubles involucradas en la regulación de la respuesta inmune; con una función definida (Vilcek y Feldmann, 2004; Li y cols., 2005). Cada citocina es producida por más de un tipo celular y cada célula es capaz de producir diversos tipos de citocinas de una forma finamente regulada. Casi todos los genes de citocinas han sido clonados y secuenciados. Estos avances permiten en la actualidad que podamos adquirirlas en forma de proteínas recombinantes y utilizarlas para determinar sus propiedades antitumorales (Peralta y cols., 1993)

Estas moléculas presentan diversos mecanismos de acción a través de los cuales es probable que puedan provocar el rechazo de tumores, ya sea actuando directamente contra la célula tumoral (citólisis, citostasis, daño vascular y diferenciación celular); aumentando la expresión de moléculas del MHC de clases I y II, moléculas de adhesión y otros antígenos (algunas de ellas específicas o asociadas a tumores) y/o reclutando, expandiendo y estimulando células efectoras contra el tumor; tal es el caso para los mecanismos de acción del rechazo tumoral.

Las investigación de las características inmunológicas y de las variaciones que pueden presentar los diferentes tipos de tumores, serán de

enorme relevancia para poder iniciar en un futuro el diseño de nuevas estrategias a través de las cuales será posible incrementar el número de patologías tumorales curables.

# OBJETIVOS

Nuestro Proyecto de investigación persigue un triple objetivo, que consiste en:

1. Determinar a nivel experimental qué niveles y tipo de resistencia a drogas inducen las dosis clínicas de agentes citotóxicos que se usan en el tratamiento convencional de los pacientes afectos del tumor rhabdomiosarcoma embrionario.
2. Determinar si la resistencia inducida en los rhabdomiosarcomas embrionarios se correlaciona con cambios en la expresión de antígenos MHC, dada la importancia clínica que posee su expresión tanto en el pronóstico de la patología tumoral como en su tratamiento.
3. Determinar si existe una correlación entre los hallazgos experimentales y los clínicos, analizando la resistencia y las modulaciones de MHC en muestras de pacientes afectos de rhabdomiosarcoma embrionario.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares utilizadas en el estudio fueron líneas derivadas de RMS embrionario. Las líneas celular parentales RD, TE.32.7 y A-204 fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection). Las líneas de RMS con fenotipo resistente TE.32.7.DAC y RD-DAC fueron obtenidas en nuestro laboratorio a partir de las parentales. La línea resistente RMS-GR fue desarrollada a partir de la biopsia de un paciente con RMS embrionario que fue tratado con poliquimioterapia (doxorrubicina, vincristina, ciclofosfamida y actinomicina D).

## 2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares fueron mantenidas y crecidas en medio de cultivo Dulbecco's Eagle (Gibco) (13.37 gr de medio base), con el 10% de suero fetal bovino inactivado (Flow laboratorios) en calor húmedo a 60°C durante 30 min. El medio fue tamponado con 27 ml de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% y 10 ml buffer Hepes 1M pH 7.2 y suplementado con 40 mg gentamicina (Normon), 500 mg ampicilina (Llorente) y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 ml. Los cultivos fueron realizados en Falcons de 25 u 80 cm<sup>2</sup> de superficie útil, manteniéndose en una estufa a 37 °C y con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de las líneas resistentes TE.32.7.DAC y RD-DAC fueron suplementados con la concentración final de la droga (actinomicina D) con la que se indujo resistencia ( $0.12 \times 10^{-5}$  mM).

## 3. CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células fueron despegadas de la superficie de los Falcons mediante una solución de PBS-EDTA (0.02%), centrifugadas a 600 x g durante 5 min y lavadas 2 veces con PBS. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron a razón de  $0.5 \times 10^6$  células por ml de medio de congelación. A continuación fueron dispensadas en criotubos e introducidas

inmediatamente en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  donde permanecieron 24 h, siendo almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido.

*Medio de congelación:* suero fetal bovino, inactivado en calor húmedo a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

#### 4. INDUCCIÓN A LA RESISTENCIA DE CÉLULAS EN CULTIVO

La línea A-204 fue inducida a la resistencia mediante la exposición continuada a dosis progresivamente mayores de actinomicina D. Las células fueron inicialmente expuestas a concentraciones de  $0.6 \times 10^{-9}$  mM del fármaco. La concentración fue progresivamente duplicada cuando se observaba las células estaban adaptadas al medio de cultivo. El tiempo de adaptación de las células a cada una de las concentraciones del fármaco fue variable, aunque la media de número de pases que realizamos en cada incremento de concentración de actinomicina D fue de seis. Con este procedimiento obtuvimos dos líneas celulares que crecieron en concentraciones de actinomicina D similares a las detectadas en el suero de los pacientes afectos de RMS y tratados con dosis clínicas de este fármaco:  $1 \times 10^{-5}$  mM y  $8 \times 10^{-5}$  mM (Leuschner y cols., 2002). Las líneas obtenidas fueron denominadas A-204-1 y A-204-2, respectivamente. Ambas líneas fueron congeladas y conservadas a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en suero fetal bovino con 10% de DMSO durante 24 h. Tras este periodo fueron conservadas en nitrógeno líquido.

La actinomicina D, obtenida del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, se preparó en total esterilidad, disolviendo 500 mgr 10 ml de agua bidestilada para obtener un stok ( $3.9 \times 10^{-2}$  M) a partir del cual se implementaron los cultivos de RMS.

## 5. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD FRENTE A ACTINOMICINA D

Las líneas tanto parentales como resistentes empleadas en el estudio ( $4 \times 10^5$  células) se cultivaron en falcons o en discos multipocillos, añadiendo al medio de crecimiento, diferentes concentraciones (de carácter creciente) de actinomicina D. Después de 48 h todos los cultivos fueron despegados de sus falcons con una solución de PBS-EDTA (0.02%). Se procedió a su conteo mediante Coulter Counter siendo determinada la viabilidad celular con tinción de azul tripan. La concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ , dosis de actinomicina D a la que se produce una reducción del 50% de las células en cultivo) de las líneas parentales y resistentes fue calculada mediante una curva de porcentaje de células vivas después de someterlas a cultivo con diferentes concentraciones de actinomicina D.

A partir de la  $CI_{50}$  se obtuvo el índice o grado de resistencia (IR) definido como la razón entre la  $CI_{50}$  de la línea resistente y la  $CI_{50}$  de la línea parental.

$$IR = CI_{50} \text{ resistente} \div CI_{50} \text{ parental}$$

## 6. ESTUDIOS DE “CROSS”-RESISTENCIA

Para determinar si la resistencia originada por la exposición a actinomicina D de células de RMS provocaba resistencia a otras drogas estructuralmente relacionadas o no con ella, se realizaron experiencias de citotoxicidad con otros agentes de uso clínico habitual en el tratamiento de esta patología. Los citotóxicos elegidos fueron la vincristina y la doxorubicina (adriamicina) por estar estas incluidas dentro la poliquimioterapia aplicada a pacientes con RMS. Las experiencias fueron realizadas siguiendo el mismo



protocolo que para actinomicina D, determinado la  $CI_{50}$  para cada una de las drogas y líneas mediante curvas de porcentaje de células vivas después de su crecimiento en diferentes concentraciones de ambos fármacos. De igual forma, el IR para cada uno de los fármacos se obtuvo utilizando las  $CI_{50}$  de las líneas parentales y resistentes.

Citostáticos vincristina y doxorubicina: ambos fueron obtenidos a través del Hospital Clínico de Granada, preparándose un stock de igual forma que la actinomicina D, para suplementar los medios de cultivo con diferentes concentraciones

## 7. DETERMINACIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA EN LÍNEAS DE RMS

El estudio de la expresión de mdr1/p-glicoproteína en las células RMS se llevó a cabo utilizando sondas específicas para este gen y mediante la técnica de Northern blot.

### 7.1. Obtención de sondas y marcaje

Para la obtención de las sondas se eligieron dos secuencias de los genes de interés, en nuestro caso mdr1 y beta-actina, y se procedió a su generación mediante un sintetizador de oligonucleótidos (Hospital Virgen de las Nieves, Granada). Las secuencias elegidas correspondieron a: mdr1, secuencia de ADNc de las posiciones 3027- 3049 y beta-actina, secuencia del ADNc de las posiciones 1874-1898

Los oligonucleótidos fueron disueltos en TE, estimando su concentración mediante espectrofotometría. Posteriormente fueron congelados a  $-20^{\circ}$  hasta su utilización para el marcaje. El marcaje radioactivo ( $P_{32}$ ) de la sonda se llevó a cabo según el protocolo descrito por Sambrook y cols. (2001).

## **7.2. Extracción de ARN de las células RMS**

Se utilizaron cultivos de  $10^6$ - $10^{10}$  células que fueron despegadas mediante PBS-EDTA, lavadas con PBS a 4°C dos veces y posteriormente centrifugados a 600 x g durante 10 min, obteniéndose un pellet celular. Los pellet fueron resuspendidos en 7.5 ml de tiocianato de guanidina 4 M y homogenizados suavemente con una jeringa 10-15 veces a 4°C. La lisis se realizó adicionando 800 µl de Sarcosil al 20% y volviendo a homogeneizar 3-5 veces con la jeringa.

La obtención del ARN a partir del homogenado se llevó a cabo utilizando un gradiente de densidad de CICs, depositando 3.5 ml de la solución de CICs en el tubo de ultracentrífuga y añadiendo sobre éste suavemente el producto de la lisis. Utilizando un rotor Ti 50, centrifugamos a 41.000 rpm, a 21°C durante 18-20 h (Ultracentrífuga Beckman, L-8-60M). Transcurrido este tiempo, desechamos el sobrenadante, quedándonos con el pellet transparente; lo lavamos con 1 ml de etanol al 70% y tras decantar lo dejamos secar.

El pellet fue resuspendido en 500 µl de agua bidestilada estéril y calentado a 60°C durante 5 min para conseguir la completa disolución del ARN. Tras una centrifugación de 3 min se desechó el pellet (impurezas) y se pasó el sobrenadante a otro tubo. La precipitación del ARN se llevó a cabo añadiendo: 1/10 de acetato sódico 3 M pH 5.2, 2 volúmenes de etanol absoluto y manteniendo la muestra -20°C durante 12 h. El precipitado se recogió por centrifugación a 13.000 x g en microcentrífuga a 4°C durante 15 min. Tras deshechar el sobrenadante se dejó secar el pellet y se disolvió en agua bidestilada y estéril. La concentración fue determinada por espectrofotómetro de ultravioletas a una densidad óptica de 260 nm.

Solución de tiocianato de guanidina 4 M: tiocianato de guanidina 4 M, 10 mM de Tris-ClH pH 7.4 y 7% de b-mercaptoetanol.

Solución de CICs: Preparada a una concentración final de 5.7 M de CICs y EDTA 10 mM pH 8.

Un  $\mu\text{gr}$  de ARN fue analizado por electroforesis a 80 V durante 2 h en un gel de agarosa al 1%. La visualización del ARN por transiluminador de ultravioletas nos permitió comprobar que no se encontraba degradado.

### 7.3. Desnaturalización de ARN

En tubos con 12  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril (que contenían 5  $\mu\text{gr}$  de RNA) se procedió a añadir 25  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada (BRL), 8  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 37% (Merck) y 10  $\mu\text{l}$  de 10 x MOPS. Las muestras se incubaron a 65°C durante 5 min y rápidamente se enfriaron en hielo durante 5 min para conseguir su desnaturalización. A cada muestra se le añadió 5  $\mu\text{l}$  de glicerol al 50% (v/v) con de azul de bromofenol (0.1 mgr/ml) y bromuro de etidio (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para que posteriormente pudiésemos visualizar las muestras de ARN con luz ultravioleta.

Tampón 20 x MOPS: Se prepara con MOPS 0.4 M, acetato sódico 0.1 M y EDTA 0.02 M, pH 7. Con una dilución 1/2 de este tampón preparamos la solución de 10 x MOPS.

### 7.4. Electroforesis de ARN en gel desnaturalizante

La electroforesis del ARN se realizó en un gel de agarosa (1%) al cual se le adicionó un 5% (v/v) de 20 x MOPS antes de calentarlo hasta ebullición y un 16% de formaldehído cuando la agarosa se había enfriado (50°C). Las

muestras con 20  $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$  de ARN fueron cargadas en los pocillos y la cubeta se relleno de tampón de electroforesis (1 x MOPS). La electroforesis se realizó a 120 V durante 6-8 horas a temperatura ambiente. El bromuro de etidio adicionado a las muestras nos permitió visualizar por luz ultravioleta la electroforesis comprobando que todos los carriles presentaban la misma cantidad de ARN.

### **7.5. Northern blot o transferencia de ARN**

El dispositivo de transferencia se realizó según lo descrito por Sambrook y cols. (2001) utilizando las membranas de hibridación previamente humedecidas con agua desionizada durante 15 min. Como tampón de transferencia utilizamos NaOH 50 mM., manteniendo la transferencia a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo la membrana fue lavada durante 5 min con 2 x SSC para eliminar los posibles restos de agarosa que hubiesen podido quedar en el filtro.

Stok de 20 x SSC: C1Na 3M y citrato trisódico 0.3 M.

### **7.6. Hibridación**

La membrana se prehibridó con 20-30 ml de la solución de hibridación en un baño a 42°C y con agitación constante durante al menos 1 hora. Tras realizar la prehibridación la membrana se puso en contacto con la sonda deshibridada y marcada (ver anteriormente), en una proporción de  $1.5 \cdot 10^6$  cpm/ml de tampón de prehibridación y esperma de salmón (20  $\mu\text{gr}$  por cada ml de tampón), el cual al igual que la sonda previamente había sido desnaturalizado a 100°C durante 10 min y enfriado 5 min en hielo. El esperma de salmón evita que la sonda se una inespecíficamente al filtro. La hibridación se realizó a 42°C durante 24 h en un baño de agitación constante.

Tampón de hibridación: Este tampón se prepara al 50% de formamida, 20% de sulfan dextrano y 1% de SDS. Se calienta a 42°C durante 10 min y se le adiciona 5.8 gr de CINa.

Una vez realizada la hibridación, el filtro se sometió a una serie de lavados con agitación constante: 4 lavados con 100 ml de 2 x SSC a temperatura ambiente 5 min; 2 lavados con 200 ml de 2 x SSC y 1% de SDS a 55°C durante 30 min. Y 2 lavados con 100 ml de 0.1 x SSC a temperatura ambiente 30 min. Para obtener la autoradiografía la membrana se situó en un chasis dejando que impresionara una placa radiográfica durante el tiempo adecuado a una temperatura de - 80° C.

## **8. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS MHC EN CÉLULAS DE RMS. FACScan**

La determinación de los niveles de expresión de moléculas MHC en líneas de RMS parentales y resistentes se realizó mediante fluorocitometría de flujo (FACScan). Se cultivaron células de las diferentes líneas hasta que alcanzaron su fase exponencial de crecimiento. Las células fueron despegadas de los frascos de cultivo utilizando una solución de PBS-EDTA (0.02%) centrifugadas en un tubo universal a 600 x g a 4°C y lavadas dos veces con PBS frío. Tras recoger las células por centrifugación a 600 x g durante 5 min, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células fueron fijadas con formaldehído al 2% durante 10 min. a -20° después de lo cual se lavaron inmediatamente tres veces con PBS a 4°. Posteriormente las células fueron incubadas durante 30 min con 20  $\mu$ l a la dilución óptima de un primer anticuerpo que reconoce específicamente la molécula objeto de estudio: antígenos HLA de clase I.

Las células se lavaron dos veces en PBS frío, y fueron reincubadas durante 30 min con 20 µl de antiinmunoglobulina (anti-IgG) de conejo, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-labellet rabbit anti-mouse immunoglobulin; Dako) a una dilución 1:50. Por último las células fueron lavadas dos veces en PBS frío y fijadas en formaldehído al 1%.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:  
W6/32 que reconoce un determinante común de las cadenas A, B y C de HLA de clase I  
GRH1 que reconoce la beta-2-microglobulina de antígenos HLA de clase I.  
\*Todos los anticuerpos fueron obtenidos del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. (Barnstable y cols., 1978 y Cabrera y cols., 1986).

El análisis de la fluorescencia se realizó mediante FACScan. El análisis de los resultados se basó en el conteo de  $1 \times 10^4$  células. Los resultados fueron obtenidos como intensidad media de fluorescencia. El porcentaje de incremento en la media de fluorescencia se obtuvo a partir de la media de fluorescencia basal e inducida.

Porcentaje de incremento de fluorescencia=  $(MFI-MFB/MFB) \times 100$ ,  
donde MFI=media de fluorescencia inducida y MFB= media de fluorescencia basal.

## **9. BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS RMS MEDIANTE VERAPAMILLO**

Para determinar la influencia de P-gp en el desarrollo de resistencia en líneas RMS frente a citotóxicos de uso habitual el tratamiento clínico de los RMS, se realizaron experiencias con cultivos celulares en presencia del

agente verapamilo. El verapamilo provoca un bloqueo de los canales de calcio inhibiendo la acción de bomba de eflujo de P-gp y volviendo, por tanto, las células resistentes más sensible a los fármacos antitumorales. Cultivos de las líneas parentales y resistentes de RMS fueron crecidos en ausencia y en presencia de verapamilo a una concentración no tóxica (10mM). Estos cultivos fueron tratados con los citotóxicos actinomicina D, vincristina y doxorubicina a diferentes concentraciones (concentraciones crecientes). Tras un periodo de 72 h de incubación los cultivos fueron despegados de sus falcons con una solución de PBS-EDTA (0.02%) procediendo al conteo celular mediante Coulter Counter. La curva de porcentaje de células vivas después de someterlas a cultivo con diferentes concentraciones drogas nos permitió obtener la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ). El IR se obtuvo para cada uno de los fármacos siguiendo la metodología anteriormente expuesta.

## **10. ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Las células inducidas a la resistencia fueron sometidas a análisis mediante microscopía óptica con el objetivo de observar modificaciones en su morfología que estuviesen relacionadas con el desarrollo de resistencia a drogas. Por otra parte, cultivos celulares de ambos tipos celulares fueron sometidos a estudio mediante microscopía electrónica para observar modulaciones relacionadas con sus características ultraestructurales.

### **10.1. Fijación de las células**

A partir de cultivos de las líneas a analizar se obtuvieron botones celulares de  $5 \times 10^6$  células. Los pellet celulares fueron fijados con un tampón de cacodilato sódico 0.1 M (pH 7.2-7.5) con glutaraldéhidido al 4%, durante un periodo de 14 a 19 h a 4°C. Las muestras fueron lavadas en el mismo tampón suplementado con sacarosa hasta alcanzar una concentración final de 0.25 M, durante 20-22 h, a 4°C. Se realizó postfijación en tetróxido de

osmio (Merck) al 1% en tampón de Milloning, durante 2 h y 30 min con un lavado posterior en el mismo tampón durante 1 h.

Las muestras fueron posteriormente deshidratadas en una batería de alcoholes creciente: un paso de 15 min en alcoholes de 30° y 50°; 1h y 30 min en alcohol de 70°, al que se le añadió acetato de uranilo a saturación y, por último, dos cambios de 30 min en alcoholes de 90° y 100°.

## 10.2. Inclusión de la muestra

La resina de inclusión se obtuvo de la siguiente forma: la solución base se realizó a partir de la mezcla a partes iguales de una solución A y una solución B. Se añadieron por cada 10 ml de esta solución, 0.15 ml de p-dimetilfenol (DMP 30) (Serva).

Las muestras fueron introducidas dos veces en óxido de propileno durante 15 min y una vez en una mezcla 1:1 (v/v) de óxido de propileno y "Epon" durante dos horas y, por último, fueron transferidas a cápsulas de gelatina en las que previamente se habían vertido unas gotas de "Epon". Las cápsulas se rellenaron con resina y se colocaron en estufa (3 días) a 37° C, 45° C y 60° C (24 h en cada temperatura) para la polimerización de la resina.

*Solución A:* Epon 812 (Serva) 62 ml y Dodecenylsuccinic anhídrido (DDSA) (Serva) 100 ml. *Solución B:* Epon 812 (Serva) 100 ml Metilnadic anhídrido (MNA) (Serva) 89 ml

## 10.3. Cortes ultrafinos

Las muestras fueron sometidas a cortes ultrafinos en un Ultracut E (Reichert-Jun). Los cortes se realizaron con un grosor de 60-70 nm de grosor, utilizando cuchillas de vidrio.



#### 10.4. Método de tinción

La tinción de las rejillas se realizó con citrato de plomo y acetato de uranilo. La tinción se llevó a cabo cubriendo una placa de Petri con cera de dentista. Las rejillas se dejaron durante 30 min con unas gotas de una solución de acetato de uranilo al 5%, y después fueron lavadas durante 1 min en agua destilada. Sobre esta superficie hidrófoba se añadieron unas gotas de la solución de citrato de plomo, colocando las rejillas sobre ellas durante unos 20 min. Para evitar la aparición de precipitados provocados por la presencia de anhídrido carbónico, se colocaron en la placa lentejas de hidróxido sódico, tapando posteriormente la placa. Antes de proceder a la lectura las rejillas se lavaron cuidadosamente en agua destilada.

*Solución citrato de plomo: 1.33 gr nitrato de plomo y 1.76 gr de citrato sódico (dihidratado) en 30 ml de agua destilada (hervida). Posteriormente adicionamos: 6.5 ml de hidróxido sódico 1N, completando con agua destilada hasta 50 ml y ajustando el pH a 12. Filtrar la solución final con un filtro de 45 mm de diámetro (Millipore, HA), inmediatamente antes de usar.*

#### 11. MUESTRAS DE TEJIDO DE PACIENTES CON RMS

Con el objeto de determinar la influencia del tratamiento clínico habitual a que son sometidos los pacientes con RMS sobre el desarrollo de resistencia mediada por *mdr1* en las células tumorales, se realizó una selección de muestras de tejido biopsiado que cumplieran una serie de requisitos para mantener la homogeneidad del grupo de estudio. En primer lugar se seleccionaron muestras de pacientes que habían sido diagnosticados de RMS de tipo embrionario siguiendo el protocolo de diagnóstico histoquímico determinado por Newton y cols. (1995). En segundo lugar, mediante el análisis de la historia clínica, se seleccionaron aquellos

pacientes que habían sido sometidos a una biopsias posterior al tratamiento. Por ultimo, entre este grupo de pacientes, se seleccionaron aquellos que habían sido sometidos sólo a tratamiento con quimioterapia convencional antes de la toma de la muestra. Se descartaron los pacientes que por algún motivo (localización. grado etc) habían sido sometidos a radioterapia. El resultado fue la obtención de un grupo de muestras de estudio, obtenidas de los archivos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada), que estaba constituido por catorce biopsias sobre las cuales se había realizado el estudio histopatológico.

La media de edad de los pacientes se situó en seis años con un rango entre 2 y 22 años. De las muestras analizadas 9 pertenecía a hombres y cinco a mujeres. La localización anatómica del sitio primario de la lesión fue variable.

El estudio incluyó cinco RMS con localización orbitaria, tres que fueron detectados primariamente en el oído, dos RMS localizados en la cara cerca del hueso maxilar y otros dos situados en la zona retroperitoneal. Por último, se incluyeron también en el estudio, dos RMS embrionarios más, uno situado en la zona pélvica y otro localizado en el miembro inferior (muslo). Todos los RMS se caracterizaron por haber sido sometidos en algún momento de su evolución, tratamiento con agentes quimioterapéuticos de uso habitual.

## **12. DETERMINACIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS**

### **12.1. Obtención de RNA total de las muestras de tejido**

El ARN total fue obtenido siguiendo el protocolo de Cao y cols. (1998) a partir de cortes residuales de tejido de RMS embrionarios. Las secciones fueron introducidas en un tubo de centrifuga s con 1 ml de xileno durante 10

min y posteriores lavados mediante un gradiente de alcoholes (100, 70 y 50%). Tras su centrifugación y secado, las muestras fueron sometidas a la acción de un buffer de digestión durante 12 a 30 h a 54°C. Después de una completa solubilización, la muestra fue incubada a 95°C durante 10 min para inactivar la proteinasa K. Añadimos 1 ml de solución de desnaturalización y 100 µl de acetato sódico (2M, pH 4). Posteriormente, se le añadió 1.5 ml de fenol saturado y 100 ml de cloroformo:isoamiloalcohol (49:1). La mezcla fue centrifugada a máxima velocidad durante 20 min a 4°C. La fase acuosa resultante fue recogida y pasada a otro tubo de centrifuga, procediendo al precipitado del ARN mediante etanol absoluto frío.

Buffer de digestión: 0.1M TRIS-HCl, 25 µM EDTA, 1% SDS (pH 7.3) y 500 µgr de proteinasa K.  
Solución de desnaturalización: 4M isotiocianato de guanidina, 25mM citrato sódico (pH 7.0) 0.5% N-lauril-sarcosina y 0.1M beta-mercaptoetanol

Después de centrifugar, el pellet de ARN fue resuspendido en 0.3 ml de la solución de desnaturalización y de nuevo precipitado con etanol. Después de incubar el tubo a -80°C durante 20 min, el ARN fue recogido de nuevo mediante centrifugación a máxima velocidad durante 20 min a 4°C. El pellet fue lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido en agua libre de ARNasas. Dicho ARN fue conservado a -80°C hasta el momento de su uso.

El ARN fue examinado en un gel de agarosa al 1% para determinar su no degradación y su concentración fue estimada espectrofotométricamente antes de su uso para PCR.

## 12.2. Transcriptasa reversa

Utilizando ARN total de las muestras de tejido se procedió a realizar transcriptasa reversa mediante kit (Promega). Cada tubo de reacción contenía un volumen total de 20  $\mu$ l compuestos de:

- ARN total (1  $\mu$ gr)
- tampón de transcriptasa reversa 10X
- proteína inhibidora de RNAsa
- transcriptasa reversa
- poli T
- dexosirribonucleótidos trifosfato
- Agua hasta 20  $\mu$ l

Los tubos fueron calentados a 94°C durante 2 min para desnaturalizar el ARN y rápidamente fueron enfriados en hielo. La reacción de la transcriptasa reversa tuvo lugar a 42°C durante 15 min. Tras este periodo los tubos fueron enfriados 5 min en hielo.

## 12.3. Reacción en cadena de la polimerasa

El resultado de la transcriptasa reversa fue diluido al 1/10 en agua destilada. Se utilizaron 10  $\mu$ l para la reacción en cadena de la polimerasa. Cada tubo de reacción contenía:

- resultado de la transcriptasa reversa (10  $\mu$ l)
- buffer de Taq polimerasa 10X
- dexosirribonucleotidos trifosfato
- primers
- taq polimerasa
- Agua hasta 100  $\mu$ l

Los primers utilizados fueron preparados por el Servicio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves de Granada. Los correspondientes al cDNA de *mdr1* permiten un amplificado de 158 pares de bases y fueron:

a. Primer sentido: **5' ATATCAGCAGCCCACATCAT 3'** que se corresponde con cDNA de *mdr1* (3007- 3026).

b. Primer antisense: **5' GAAGCACTGGGATGTCCGGT 3'** que se corresponde con cDNA de *mdr1* (3141- 3160).

Los correspondientes al cDNA de beta-actina fueron:

a. Primer sentido: **5' ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3'** que se corresponde con el cDNA de beta-actina (1854-1873).

b. Primer antisense: **5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 5'** que se corresponde con cDNA de beta -actina (2151-2170).

Cada ciclo consistía en 1 min de desnaturalización a 94°C, seguido de 2 min a 58°C para que se produjese el acoplamiento de los primers y 3 min de extensión a 72°C. La amplificación fue realizada con 35 ciclos con una extensión final de 7 min a 72°C. La amplificación de la beta-actina se realizó con el mismo procedimiento pero con una temperatura de acoplamiento de 55 °C.

Los productos de la PCR correspondientes a *mdr1* y beta-actina fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 80 V durante 2 h. El gel fue teñido con bromuro de etidio y examinado mediante transiluminador de ultravioleta.

Las bandas fueron sometidas a estudio densitométrico comparando la señal obtenida de la amplificación del gen *mdr1* con la correspondiente a la de beta-actina en cada una de las muestras. Para ello las imagenes fueron escaneadas y analizadas usando el sistema de documentación he de

(Quantity One Analysis Software) lo que permitió obtener la expresión relativa de mdr1 como la razón entre mdr1/beta-actina.

### **13. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS MHC EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS**

La expresión de antígenos HLA de clase I en las muestras de RMS se determinó mediante estudio inmuohistoquímico. Secciones de tejido de RMS embrionarios fueron teñidas usando el método de la peroxidasa tal y como describe Fernández y cols. (1991). Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron W6/32 (a una dilución 1/50) y GRH1 (a una dilución 1/50) que reconocen HLA de clase I. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 30 min. en una cámara húmeda a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa fue añadido tras realizar tres lavados con PBS. La reacción fue visualizada mediante una solución de PBS que contenía diaminobenzidina-tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO). La intensidad de la tinción fue estimada por dos observadores independientes. En base a ella las muestras fueron marcadas como 0 (sin tinción), 1 (tinción de intensidad débil), 2 (tinción de intensidad moderada) y 3 (tinción de intensidad fuerte). Controles positivos y negativos fueron realizados durante las experiencias.

# RESULTADOS

## **1. NIVELES DE RESISTENCIA GENERADOS POR DOSIS TERAPÉUTICAS DE ACTINOMICINA D EN RMS. LÍNEAS A-204-1 Y A-204-2**

Para determinar el grado de resistencia que inducen dosis terapéuticas de actinomicina D, una de las drogas de elección en el tratamiento de los RMS, la línea de RMS embrionario A-204 (obtenida de la ATC) se cultivó en presencia de concentraciones progresivamente crecientes del fármaco (proceso descrito en Material y Métodos) hasta alcanzar concentraciones próximas a las determinadas en el suero de pacientes tratados con quimioterapia ( $1 \times 10^{-5}$  mM y  $8 \times 10^{-5}$  mM). Mediante estudios de proliferación se pudo determinar la  $CI_{50}$  para actinomicina D y la resistencia cruzada que presentaron dichas líneas

Como se observa en la Tabla 1, la  $CI_{50}$  para actinomicina D de las líneas A-204-1 y A-204-2 fue 34.4 y 96.66 veces mayor que la observada en la línea parental A-204, indicando un gran aumento del grado de resistencia de ambas líneas para este fármaco. Además, ambas líneas presentaron aumento de la resistencia cruzada para vincristina y doxorubicina. Así, el grado de resistencia para vincristina fue 37.41 y 88.7 veces mayor en 204-1 y A-204-2 respectivamente, en comparación a la presentada por la línea A-204. Por último, el grado de resistencia también aumento en ambas líneas para el agente doxorubicina, aumento que fue de 22.9 y 63.95 veces en ambas líneas respectivamente en relación a la parental.

## **2. NIVELES DE RESISTENCIA A DROGAS DE USO CLÍNICO EN EL TRATAMIENTO DE RMS. LÍNEA RMS-GR.**

La línea de RMS denominada RMS-GR fue establecida previamente a partir de una biopsia de un paciente diagnosticado de RMS embrionario que fue tratado con poliquimioterapia.



**Tabla 1.** Determinación del grado de resistencia frente a drogas de uso habitual en el tratamiento del RMS, de las líneas A-204-1 y A-204-2 en relación a su línea parental A-204.

	<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>A-204</b>	$9 \times 10^{-5} \pm 0.5 \times 10^{-5}$	$3.1 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$	$17.2 \times 10^{-5} \pm 0.9 \times 10^{-5}$
<b>A-204-1</b>	$310 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5*}$	$116 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-5*}$	$394 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-5*}$
<b>A-204-2</b>	$870 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-5*}$	$275 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5*}$	$1100 \times 10^{-5} \pm 12 \times 10^{-5*}$

<b>Grado de resistencia</b>	<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>A-204-1</b>	<b>34.4</b>	<b>37.41</b>	<b>22.9</b>
<b>A-204-2</b>	<b>96.66</b>	<b>88.7</b>	<b>63.95</b>

*El grado de resistencia se determinó mediante la razón entre la  $CI_{50}$  (mM) de las líneas resistentes A-204-1 y A-204-2 y la  $CI_{50}$  de la línea parental A-204. Todos los datos son media  $\pm$  SEM de cuatro experiencias diferentes. La significatividad ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante comparación estadística usando el test de la t de Student.*

Para valorar los niveles de resistencia de esta línea se realizaron cultivos de las células en presencia de actinomicina D, vincristina y doxorubicina lo que nos permitió determinar su  $CI_{50}$ . La línea RMS-GR presentó unas  $CI_{50}$  de 1750, 580 y 1700  $\times 10^{-5}$  mM para actinomicina D, vincristina y doxorubicina respectivamente. Como se observa en la Tabla 2, los valores de la  $CI_{50}$  presentados por esta línea, que había sido sometida a la exposición de una terapia combinada in vivo, fueron significativamente superiores a los presentados por las líneas resistentes inducidas sólo con actinomicina D (A-204-1 y A-204-2).

**Tabla 2.** Tabla comparativa de la  $CI_{50}$  (mM) de las líneas resistentes A-204-1 y A-204-2 y la línea RMS-GR, frente a drogas de uso terapéutico habitual en el tratamiento del RMS.

	Actinomicina-D	Vincristina	Doxorrubicina
<b>A-204-1</b>	$310 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5}$	$116 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-5}$	$394 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-5}$
<b>A-204-2</b>	$870 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-5}$	$275 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5}$	$1100 \times 10^{-5} \pm 12 \times 10^{-5}$
<b>RMS-GR</b>	$1750 \times 10^{-5} \pm 13 \times 10^{-5*}$	$580 \times 10^{-5} \pm 51 \times 10^{-5*}$	$1700 \times 10^{-5} \pm 23 \times 10^{-5*}$

*Todos los datos son media  $\pm$  SEM de cuatro experiencias diferentes. La significatividad ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante comparación estadística usando el test de la t de Student.*

### **3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA DE LAS LÍNEAS A-204-1 Y A-204-2 CON OTRAS LÍNEAS RESISTENTES. LÍNEAS RD.DAC Y TE.32.7-DAC.**

Para este estudio, se utilizaron dos líneas parentales derivadas de RMS embrionario obtenidas de la ATCC (RD y TE.32.7) y sus derivados resistentes (RD-DAC y TE.32.7-DAC), obtenidas previamente mediante la exposición continuada a concentraciones crecientes de actinomicina D. Las líneas resistentes fueron mantenidas en cultivo a concentración subclínicas ( $0.12 \times 10^{-5}$  mM) del fármaco.

Las líneas con fenotipo resistente presentaron una  $CI_{50}$  y por tanto un grado de resistencia mayor que las parentales para los tres fármacos examinados (vincristina, doxorubicina y actinomicina). Como se observa en la Tabla 3, la línea RD-DAC fue 15, 48 y 36 veces más resistente a actinomicina D, vincristina y doxorubicina respectivamente, que la línea parental RD. Similares resultados fueron obtenidos en la línea resistente TE.32.7-DAC que resultó ser 20, 62 y 40 veces más resistente a actinomicina D, vincristina y doxorubicina respectivamente, en relación a su correspondiente línea parental TE.32.7.

Tal y como se observa en la Tabla 4, tanto RD-DAC como TE.32.7-DAC presentaron aumentos en el grado de resistencia menores para actinomicina D que los observados en las líneas inducidas con concentraciones clínicas del fármaco (A-204-1 y A-204-2). Sin embargo, sólo la línea A-204-2, obtenida con las concentraciones clínicas más elevada de actinomicina D presentó un mayor grado de resistencia a doxorubicina y vincristina que las líneas resistentes RD-DAC y TE.32.7-DAC.

**TABLA 3.** Determinación del grado de resistencia frente a drogas de uso habitual en el tratamiento del RMS, de las líneas RD-DAC y TE.32.7-DAC en relación a sus líneas parentales RD y TE.32.7.

	<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>RD</b>	$8.6 \times 10^{-7} \pm 3.2 \times 10^{-7}$	$0.7 \times 10^{-7} \pm 0.002 \times 10^{-7}$	$29.2 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-7}$
<b>RD-DAC</b>	$128.3 \times 10^{-7} \pm 37 \times 10^{-7*}$	$34 \times 10^{-7} \pm 7 \times 10^{-7*}$	$1060 \times 10^{-7} \pm 200 \times 10^{-7*}$
<b>TE.32.7</b>	$15.3 \times 10^{-7} \pm 1.5 \times 10^{-7}$	$1.2 \times 10^{-7} \pm 0.03 \times 10^{-7}$	$40.1 \times 10^{-7} \pm 0.6 \times 10^{-7}$
<b>TE.32.7-DAC</b>	$301.4 \times 10^{-7} \pm 42 \times 10^{-7}$	$74.5 \times 10^{-7} \pm 9 \times 10^{-7}$	$1624 \times 10^{-7} \pm 150 \times 10^{-7}$

<b>Grado de resistencia</b>			
	<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>RD-DAC</b>	<b>14.91</b>	<b>48.57</b>	<b>36.30</b>
<b>TE.32.7-DAC</b>	<b>19.69</b>	<b>62.08</b>	<b>40.49</b>

*El grado de resistencia se determinó mediante la razón entre la  $CI_{50}$  (mM) de las líneas resistentes y la  $CI_{50}$  de las líneas parentales. Todos los datos son media  $\pm$  SEM de cuatro experiencias diferentes. La significatividad (\* $p < 0.05$ ) se determinó mediante comparación estadística usando el test de la t de Student.*

**TABLA 4.** Comparación de los grados de resistencia de líneas de RMS con fenotipo resistente frente a citotóxicos de uso habitual en el tratamiento de RMS.

	<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>A-204-2</b>	<b>96.66</b>	<b>88.7</b>	<b>63.95</b>
<b>A-204-1</b>	<b>34.4</b>	<b>37.41</b>	<b>22.9</b>
<b>RD-DAC</b>	<b>14.91</b>	<b>48.57</b>	<b>36.30</b>
<b>TE.32.7-DAC</b>	<b>19.69</b>	<b>62.08</b>	<b>40.49</b>

*El incremento en los niveles de resistencia (grado de resistencia) fue determinado como la ratio entre la  $CI_{50}$  de la línea resistente y la parental determinada en cultivos de las células en presencia de las diferentes drogas testadas: vincristina, actinomicina D y doxorrubicina. La línea A-204-2 presentó el mayor grado de resistencia por los tres fármacos.*

#### **4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MDR1/P-GLICOPROTEÍNA EN LÍNEAS DE RMS**

##### **4.1. Expresión en la línea A-204 y sus derivados resistentes**

Para determinar los niveles de expresión de *mdr1*/P-glicoproteína que inducen dosis terapéuticas de actinomicina D en células de RMS embrionario, el ARNm de las líneas A-204 parental y A-204-1 y 2 se analizaron mediante Northern blot. Hibridaciones una sonda específica para *mdr1* y con otra que reconoce el gen de la beta-actina, nos permitieron obtener valores relativos y comparables de la expresión de este gen de resistencia gracias al estudio mediante densitometría de geles.

La línea parental A-204 presentó una débil, pero apreciable expresión de *mdr1*. Sin embargo, en las líneas resistentes derivadas de esta (A-204-1 y A-204-2) se observó una señal de hibridación mucho más intensa que indicaba un significativo aumento de la expresión de este gen (Figura 1A).

El estudio densitométrico mediante normalización de bandas y usando la señal de la beta-actina, determinó un aumento de más de 6 veces en la expresión del gen *mdr1* en A-204-1 ( $7 \pm 1.5$ ) y A-204-2 ( $6.8 \pm 1.3$ ) en comparación con la expresión determinada para la línea parental A-204 ( $1.2 \pm 0.3$ ) (Figura 1B). Estos resultados determinan por tanto un aumento significativo de la expresión de *mdr1*/P-glicoproteína en las líneas A-204 inducidas a la resistencia con dosis terapéuticas de actinomicina D.

##### **4.2. Estudio comparativo con la expresión en las líneas RMS-GR, RD y TE.32.7 y sus derivados resistentes.**

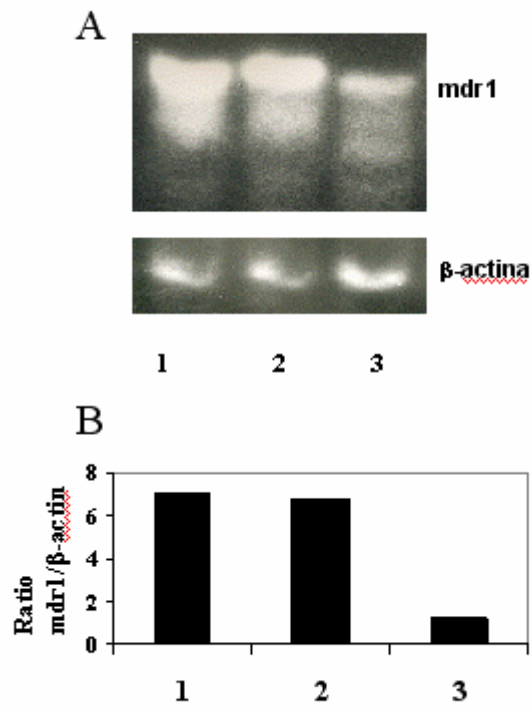
Para determinar los niveles de ARNm del gen *mdr1* implicados en el fenómeno de resistencia a drogas desarrollado por las líneas de RMS y que estos fueran comparables con los de las líneas resistentes derivadas de A-

204, se volvió a utilizar la técnica de Northern blot, con normalización de las bandas de *mdr1* en función de la expresión de beta-actina.

Como se muestra en la Figura 2B, los resultados de la hibridación demostraron una nula presencia de transcritos del gen *mdr1* en las líneas parentales RD y TE.32.7. Por el contrario, diferentes niveles de ARNm de *mdr1* fueron detectados en las líneas resistentes analizadas. Así, en la línea RD-DAC los valores encontrados tras la normalización de las bandas fueron de  $4.5 \pm 0.4$ . Similares valores de expresión fueron observados en la línea resistente TE.32.7-DAC ( $4.7 \pm 0.4$ ). La línea RMS-GR fue la que presentó unos mayores niveles de ARNm de *mdr1* alcanzando, tras la normalización con la señal de beta-actina, un valor de  $11 \pm 1.3$ .

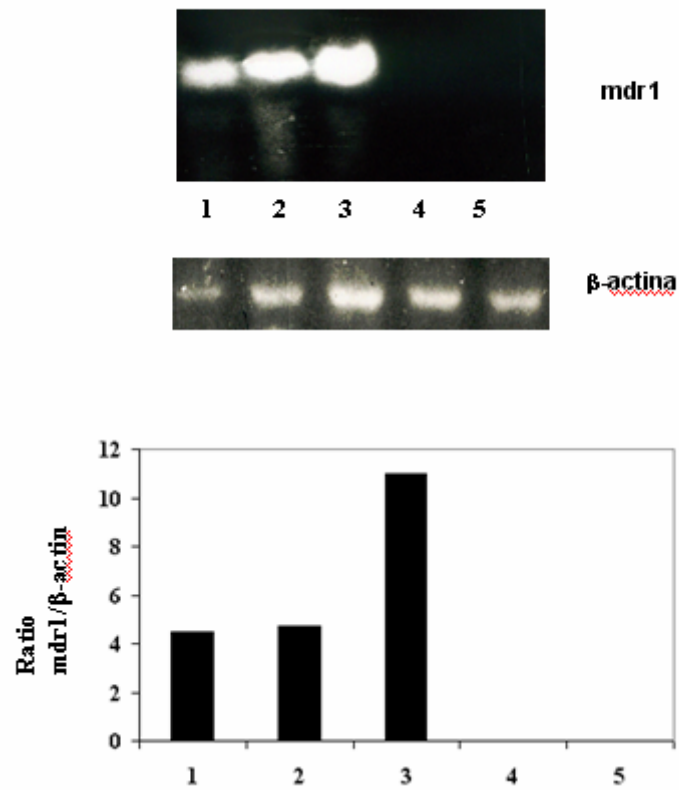
Estos resultados indican un aumento en la expresión del gen *mdr1* en todas las líneas resistentes, aunque los niveles son significativamente menores en las líneas TE.32.7DAC y RD-DAC, en comparación con los encontrados en la línea RMS-GR, en donde la presencia de P-glicoproteína representó más del doble que la encontrada en las líneas anteriormente citadas.

Cuando se compararon las expresiones de P-glicoproteína de estas líneas (TE.32.7DAC, RD-DAC y RMS-GR) con las de las líneas resistentes derivadas de A-204, pudimos observar que la expresión en la línea RMS-GR fue algo mayor que la observada en ambas (A-204-1 y 2); sin embargo, las líneas resistentes derivadas de RD y TE.32.7 e inducidas con dosis subclínicas de actinomicina D, presentaron menores niveles de P-glicoproteína que las derivadas de A-204.



**Figura 1.** Análisis mediante Northern blot de la expresión de *mdr1* en la línea A-204 y sus derivados resistentes. El resultado de la hibridación (A) muestra un aumento de expresión en A-204-1 (línea 1) y A-204-2 (línea 2) en comparación con la expresión en la línea parental A-204 (línea 3). La hibridación con beta-actina demostró la integridad de las preparaciones de ARN. La intensidad de las bandas fue cuantificada y normalizada mediante densitometría (B).





**Figura 2.** Análisis mediante Northern blot de la expresión de *mdr1* en la línea RD, TE.32.7, sus derivados resistentes y la línea RMS-GR. El resultado de la hibridación (A) muestra un aumento de expresión en RD-DAC (línea 1), TE.32.7-DAC (línea 2) y RMS-GR (línea 3) en comparación con la expresión en las líneas parentales RD y TE.32.7 (líneas 4 y 5). La hibridación con beta-actina demostró la integridad de las preparaciones de ARN. La intensidad de las bandas fue cuantificada y normalizada mediante densitometría (B).

## **5. NIVELES DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA DE CLASE I EN LA LÍNEA A-204 Y SUS DERIVADOS RESISTENTES.**

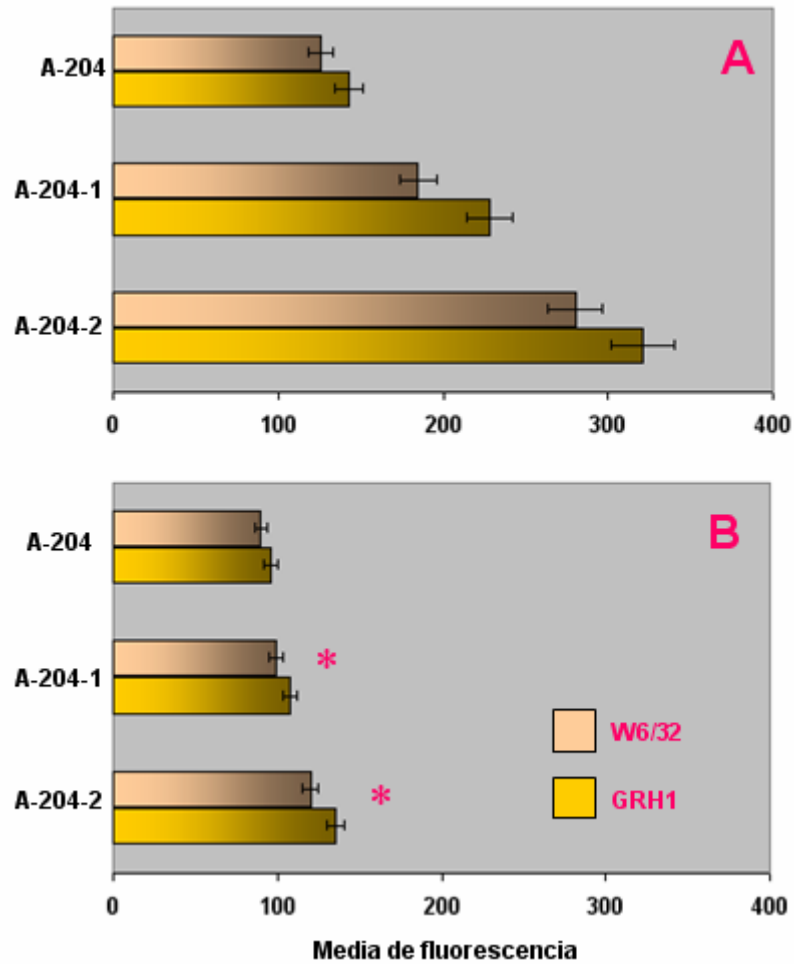
Para observar las modificaciones en la expresión de antígenos HLA de clase I inducidos por el desarrollo de resistencia a dosis terapéuticas de actinomicina D en la línea A-204, se realizó un estudio mediante fluorocitometría de flujo con los anticuerpos W6/32 y GRH1 que reconocen HLA de clase I.

Los análisis realizados utilizando el anticuerpo W6/32 demostraron un aumento significativo de la expresión de estos antígenos tanto en la línea A-204-1 como en la A-204-2 en comparación con los niveles encontrados en la línea parental A-204 (Figura 3A).

La línea A-204-1 mostró un aumento de la media de intensidad de fluorescencia del 111% utilizando el anticuerpo W6/32. Para confirmar estos resultados se realizó el mismo análisis con el anticuerpo GRH1 pudiendo observar un aumento en la expresión de HLA de clase I similar al detectado anteriormente (113% de aumento en la media de intensidad de fluorescencia).

En la línea A-204-2, inducida con mayores concentraciones de actinomicina D, el aumento en la expresión de HLA de clase I también fue mayor. Cuando el estudio se realizó con el anticuerpo W6/32, el incremento en la media de intensidad de fluorescencia se situó en un 137%. El mismo análisis realizado con el anticuerpo GRH1 permitió detectar un incremento que fue del 80%.

La línea parental A-204 mostró ligeras modificaciones en la expresión de HLA de clase I (Figura 3A).



**Figura 3.** Análisis mediante FACScan de la expresión de HLA de clase I en la línea A-204 y sus derivados resistentes antes (A) y después (B) de la exposición al agente verapamilo (10 μM). Se usaron los anticuerpos W6/32 y GRH1. Los resultados derivan de cuatro experiencias independientes (\*  $p < 0.01$ ).

## **6. ACCIÓN DEL VERAPAMILO SOBRE LOS NIVELES DE RESISTENCIA Y LA EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I EN LA LÍNEA A-204 Y SUS DERIVADOS RESISTENTES**

### **6.1. Efecto modulador del bloqueo de P-glicoproteína sobre el grado de resistencia.**

El verapamilo es un agente capaz de bloquear la acción de P-gp impidiendo su efecto de bomba de eflujo sobre los agentes citotóxicos que actúan en una célula tumoral. Utilizando dosis no tóxicas de este agente en el cultivo de células sensibles y resistentes de RMS, pudimos determinar la modulación de la citotoxicidad de los diferentes antitumorales empleados en el tratamiento de los RMS y valorar la importancia de la acción de P-gp en el grado de resistencia observado en las mismas. La Tabla 5 resumen los resultados obtenidos en las líneas A-204, A-204-1 y A-204-2 en presencia de verapamilo (24 h), lo que permitió determinar las  $CI_{50}$  de los diferentes agentes citotóxicos y comparar las modificaciones en la acción de los mismos.

Así, el incremento en el efecto citotóxico de actinomicina D en la línea A-204-1 tratada con verapamilo fue de aproximadamente 12 veces en relación al encontrado en la misma línea cultivada sin la presencia del fármaco. En la línea A-204-2, inducida con mayores concentraciones de actinomicina D, dicho incremento fue de 20 veces. Los incrementos de los efectos de vincristina y doxorubicina en las líneas A-204-1 tratadas con verapamilo se situaron en 6.3 y 39 veces respectivamente en relación a la misma línea sin tratamiento con el agente. Dichos incrementos fueron de 8 y 51.6 veces en la línea A-204-2. Finalmente el estudio realizado en la línea parental A-204 en ausencia y presencia de verapamilo demostró solo un ligero y no significativo aumento de la citotoxicidad de los tres agentes (1.5 veces para actinomicina D, 1.2 veces para vincristina y 1.7 veces para doxorubicina).

**Tabla 5.** Modificación de la toxicidad de drogas de uso habitual en el tratamiento de los RMS, en la línea A-204 y sus derivados resistentes tras tratamiento con verapamilo

		Actinomicina-D	Vincristina	Doxorrubicina
<b>A-204</b>	<b>A</b>	$9 \times 10^{-5} \pm 0.5 \times 10^{-5}$	$3.1 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$	$17.2 \times 10^{-5} \pm 0.9 \times 10^{-5}$
	<b>B</b>	$6 \times 10^{-5} \pm 0.4 \times 10^{-5}$ (1.5)	$2.56 \times 10^{-5} \pm 0.15 \times 10^{-5}$ (1.21)	$10 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$ (1.72)
<b>A-204-1</b>	<b>A</b>	$310 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5*}$	$116 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-5*}$	$394 \times 10^{-5} \pm 9 \times 10^{-5*}$
	<b>B</b>	$26 \times 10^{-5} \pm 0.5 \times 10^{-5}$ (11.9)*	$18.2 \times 10^{-5} \pm 0.6 \times 10^{-5}$ (6.37)*	$10.1 \times 10^{-5} \pm 0.5 \times 10^{-5}$ (39)*
<b>A-204-2</b>	<b>A</b>	$870 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-5*}$	$275 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5*}$	$1100 \times 10^{-5} \pm 12 \times 10^{-5*}$
	<b>B</b>	$43 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-5}$ (20.2)*	$34.3 \times 10^{-5} \pm 0.9 \times 10^{-5}$ (8.01)	$21.3 \times 10^{-5} \pm 0.8 \times 10^{-5}$ (51.64)

*El incremento de la citotoxicidad de las drogas (indicado entre paréntesis) fue calculado como la razón entre la  $CI_{50}$  (mM) de la línea en cultivo en ausencia (A) y en presencia (B) de verapamilo. Todos los datos son media  $\pm$  SEM de cuatro experiencias independientes. La significatividad (\* $p < 0.05$ ) fue determinada mediante estudio estadístico usando el test de la *t* Student.*

## **6.2. Efecto modulador del bloqueo de P-glicoproteína sobre la expresión de antígenos HLA de clase I**

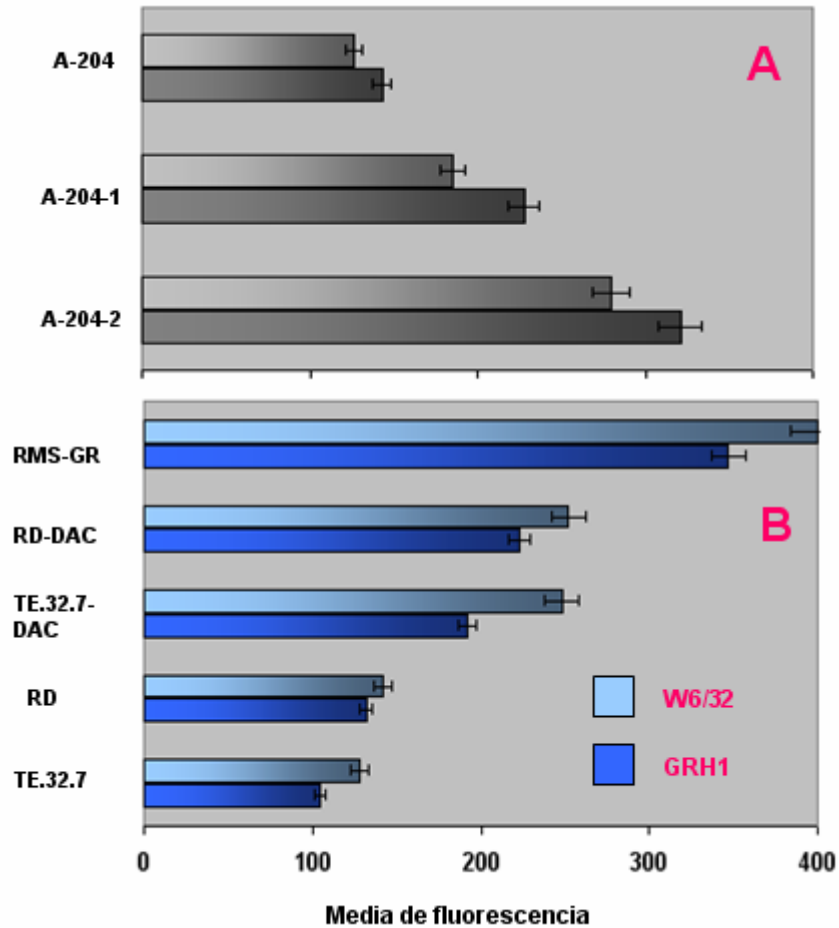
Después del tratamiento con verapamilo, el análisis mediante citometría de flujo de la expresión de antígenos HLA de clase I usando el anticuerpo W6/32 mostró una disminución de un 46.5 y 57.3% en la media de intensidad de fluorescencia en la línea A-204-1 y A-204-2 respectivamente. Dicha disminución fue mucho menor en la línea parental A-204 (16.2%) (Figura 3B). Los análisis realizados utilizando el anticuerpo GRH1 confirmaron la disminución en la expresión de dicho antígeno encontrando una reducción de un 52.6%, un 62.9% y un 18.8% en la media de intensidad de fluorescencia en las líneas A-204-1, A-204-2 y A-204 respectivamente.

## **7. ESTUDIO COMPARATIVO CON LAS LÍNEAS RMS-GR Y LOS DERIVADOS RESISTENTES DE RD Y TE.32.7.**

### **7.1. Niveles de expresión de antígenos HLA de clase I**

En general, nuestro estudio demostró un aumento significativo de la expresión de MHC de clase I en las líneas resistentes en relación a las parentales (Figura 4).

La línea RMS-GR, sometida a poliquimioterapia in vivo, presentó los mayores niveles de expresión de antígenos HLA de clase I. Dichos niveles fueron muy superiores a los encontrados en las líneas parentales A-204, RD y TE.32.7. Pero además, la expresión de HLA de clase I en esta línea fue significativamente superior a la detectada en las líneas resistentes derivadas de A-204 que fueron inducidas con dosis terapéuticas de actinomicina D (204-1 y A-204-2) y también a las determinadas en las líneas resistentes RD-DAC y TE.32.7-DAC. Los datos fueron similares tanto en el estudio realizado con el anticuerpo W6/32 como en el análisis mediante GRH1 (Figura 4).



**Figura 4.** Estudio comparativo de la expresión de HLA de clase I (FAScan) en la línea A-204 y sus derivados resistentes (A) y en las líneas RMS-GR, RD y TE.32.7 y sus derivados resistentes (B). Se usaron los anticuerpos W6/32 y GRH1. Los resultados derivan de cuatro experiencias independientes.

Por otra parte, en el estudio fluorocitométrico con el anticuerpo W6/32 realizado sobre la línea con fenotipo resistente TE.32.7-DAC demostró un incremento en la media de intensidad de fluorescencia de un 82% en relación a su línea parental. Un incremento significativo aunque ligeramente menor fue observado en la línea RD-DAC (68.9%) en relación a su línea parental RD. Los análisis realizados con el anticuerpo GRH1 confirmaron el incremento de la expresión de HLA de clase I en ambas líneas resistentes encontrando un aumento en la media de fluorescencia de un 93.7% y un 77.4% en TE.32.7-DAC y RD-DAC respectivamente y en relación a las parentales. No obstante, dichos incrementos fueron significativamente menores que los encontrados en las líneas con fenotipo resistente inducidas con dosis clínicas de actinomicina D (A-204-1 y 2) (Figura 4).

## **7.2. Modulación de los niveles de resistencia por la acción del agente verapamilo.**

Los análisis de la línea resistente RD-DAC en presencia de verapamilo determinaron un significativo aumento de la citotoxicidad de las tres drogas empleadas con un incremento de 17, 5 y 40 veces en la toxicidad de actinomicina D, vincristina y doxorubicina respectivamente (Tabla 6). Por el contrario, los aumentos en la citotoxicidad en la línea RD parental fueron muy reducidos situándose en 1.4, 1.2 y 2.6 para las tres drogas respectivamente. Ésta modificaciones también fueron observadas en la línea TE.32.7-DAC en la que el verapamilo al bloquear la acción de P-glicoproteína indujo un incremento de aproximadamente 33, 4 y 70 veces en la citotoxicidad de actinomicina D, vincristina y doxorubicina respectivamente (Tabla 6). Al igual que en la línea RD, un débil incremento en la citotoxicidad de las tres drogas sobre la línea parental TE.32.7 fue observado (1.9, 1.4 y 2.4 respectivamente). Experiencias similares, sobre la línea RMS-GR determinaron un incremento 53, 77 y 9 veces de la citotoxicidad de las mismas tres drogas (Tabla 6).



**TABLA 6.** Modificación de la toxicidad de drogas de uso habitual en el tratamiento de los RMS, en las líneas RMS-GR, RD y TE.32.7 y sus derivados resistentes, tras tratamiento con verapamilo

		<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
<b>RMS-GR</b>	A	$1750 \times 10^{-5} \pm 13 \times 10^{-5}$	$580 \times 10^{-5} \pm 51 \times 10^{-5}$	$1700 \times 10^{-5} \pm 23 \times 10^{-5}$
<b>RMS-GR</b>	B	$33 \times 10^{-5} \pm 35 \times 10^{-5*}$ (53)	$7.5 \times 10^{-5} \pm 10 \times 10^{-5*}$ (77)	$180 \times 10^{-5} \pm 17 \times 10^{-5*}$ (9)
<b>RD</b>	A	$8.6 \times 10^{-7} \pm 3.2 \times 10^{-7}$	$0.7 \times 10^{-7} \pm 0.002 \times 10^{-7}$	$29.2 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-7}$
<b>RD</b>	B	$6.1 \times 10^{-7} \pm 0.7 \times 10^{-7}$ (1.4)	$0.58 \times 10^{-7} \pm 0.05 \times 10^{-7}$ (1.2)	$11.2 \times 10^{-7} \pm 0.9 \times 10^{-7}$ (2.6)
<b>RD-DAC</b>	A	$128.3 \times 10^{-7} \pm 37 \times 10^{-7}$	$34 \times 10^{-7} \pm 7 \times 10^{-7}$	$1060 \times 10^{-7} \pm 200 \times 10^{-7}$
<b>RD-DAC</b>	B	$7.4 \times 10^{-7} \pm 8 \times 10^{-7*}$ (17.2)	$6.5 \times 10^{-7} \pm 6 \times 10^{-7*}$ (5.2)	$26.3 \times 10^{-7} \pm 13 \times 10^{-7*}$ (40.2)
<b>TE.32.7</b>	A	$15.3 \times 10^{-7} \pm 1.5 \times 10^{-7}$	$1.2 \times 10^{-7} \pm 0.03 \times 10^{-7}$	$40.1 \times 10^{-7} \pm 0.6 \times 10^{-7}$
<b>TE.32.7</b>	B	$8 \times 10^{-7} \pm 0.7 \times 10^{-7}$ (1.9)	$0.8 \times 10^{-7} \pm 0.2 \times 10^{-7}$ (1.4)	$16.2 \times 10^{-7} \pm 2.1 \times 10^{-7}$ (2.4)
<b>TE.32.7-DAC</b>	A	$301.4 \times 10^{-7} \pm 42 \times 10^{-7}$	$74.5 \times 10^{-7} \pm 9 \times 10^{-7}$	$1624 \times 10^{-7} \pm 150 \times 10^{-7}$
<b>TE.32.7-DAC</b>	B	$9 \times 10^{-7} \pm 0.9 \times 10^{-7*}$ (33.4)	$17 \times 10^{-7} \pm 0.8 \times 10^{-7*}$ (4.3)	$23 \times 10^{-7} \pm 0.2 \times 10^{-7*}$ (70.4)

*El incremento de la citotoxicidad de las drogas (indicado entre paréntesis) fue calculado como la razón entre la  $CI_{50}$  (mM) de la línea en cultivo en ausencia (A) y en presencia (B) de verapamilo. Todos los datos son media  $\pm$  SEM de cuatro experiencias independientes. La significatividad (\* $p < 0.05$ ) fue determinada mediante estudio estadístico usando el test de la t Student.*

El estudio comparativo de las modificaciones en la citotoxicidad de las drogas en las diferentes líneas analizadas nos permitió determinar un comportamiento diferente entre las líneas con fenotipo resistente inducidas sólo con D-actinomicina in vitro y la línea RMS-GR obtenida tras exposición a citotóxicos in vivo. Las líneas resistentes derivadas de A-204, RD y TE.32.7 tras el bloqueo farmacológico, mostraron una reducción muy significativa en el grado de resistencia frente a actinomicina D y doxorubicina, mientras que dicha reducción fue notablemente menor frente a vincristina. Sin embargo, en la línea RMS-GR, los citotóxicos que incrementaron más significativamente su acción fueron actinomicina D y vincristina, mientras que el tratamiento con verapamilo provocó un aumento notablemente menor de la acción de doxorubicina (Tabla 7). Por otra parte, los incrementos de acción de los citotóxicos en las líneas parentales A-204, RD y TE.32.7, fueron similares y no significativos (Tabla 7).

### **7.3. Modulación de la expresión de antígenos HLA de clase I por la acción del agente verapamilo.**

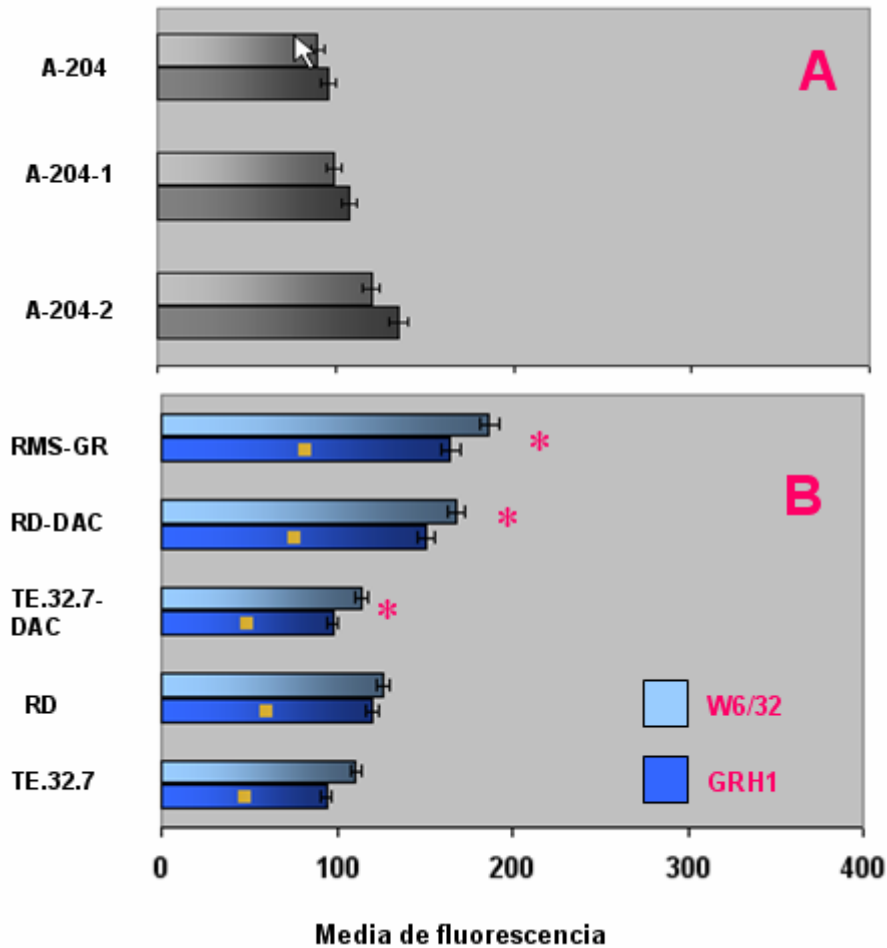
Para verificar que la aparición de expresión de P-gp en las líneas de RMS ejerce un efecto sobre la expresión de antígenos MHC, se realizó un estudio determinado la modificación de antígenos HLA de clase I en cultivos de las diferentes líneas de RMS sometidos a tratamiento con verapamilo. En general, después del tratamiento con verapamilo, nuestros resultados demostraron un significativo descenso en los niveles de expresión de antígenos HLA de clase I en las líneas con fenotipo resistente.

El estudio fluorocitométrico de la línea TE.32.7-DAC marcada con el anticuerpo W6/32, mostró un descenso de un 49% en la media de intensidad de fluorescencia. El mismo estudio en la línea resistente RD-DAC mostró también un descenso, en este caso, del 32% (Fig. 5). Por el contrario, el descenso detectado en las líneas parentales RD y TE.32.7 no fue significativo.

**Tabla 7.** Comparación de la modificación de la toxicidad de agentes de usos habitual en el tratamiento de los RMS tras tratamiento con verapamilo en la línea A-204 y sus derivados resistentes y las líneas RMS-GR, RD y TE.32.7 y sus derivados resistentes.

	<b>Actinomicina-D</b>	<b>Vincristina</b>	<b>Doxorrubicina</b>
A-204	1.5	1.21	1.72
A-204-1	11.9	6.37	39
A-204-2	20.2	8.01	51.64
<b>RMS-GR</b>	<b>53</b>	<b>77</b>	<b>9</b>
<b>RD</b>	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>	<b>2.6</b>
<b>RD-DAC</b>	<b>17.2</b>	<b>5.2</b>	<b>40.2</b>
<b>TE.32.7</b>	<b>1.9</b>	<b>1.4</b>	<b>2.4</b>
<b>TE.32.7-DAC</b>	<b>33.4</b>	<b>4.3</b>	<b>70.4</b>

*El incremento de la citotoxicidad de las drogas (indicado entre parentesis fue calculado como la razón entre la CI50 de la línea en cultivo (mM) en ausencia (A) y en presencia (B) de verapamilo.*



**Figura 5.** Estudio comparativo de la modificación de la expresión de HLA de clase I (FAScan) en la línea A-204 y sus derivados resistentes (A) y en las líneas RMS-GR, RD y TE.32.7 y sus derivados resistentes (B) tras la exposición al agente verapamilo. Se usaron los anticuerpos W6/32 y GRH1. Los resultados derivan de cuatro experiencias independientes (\*  $p < 0.01$ ).

Estos resultados fueron corroborados mediante el uso del anticuerpo GRH1, que permitió determinar un descenso en la media de intensidad de fluorescencia de la expresión de este antígeno de un 54% y un 33% en las líneas TE.32.7-DAC y RD-DAC respectivamente.

Por último, similares resultados fueron encontrados en el estudio de la línea RMS-GR. Después del tratamiento con verapamilo, el análisis mediante el anticuerpo W6/32 y GRH1 determinó una reducción significativa de la expresión de antígenos HLA de clase I que fueron similares: un 52% y 53% de reducción en la media de intensidad de fluorescencia con el primer y segundo anticuerpo respectivamente. Dicha reducción fue similar a la encontrada previamente en las líneas inducidas con dosis terapéuticas de actinomicina D y derivadas de A-204 (A-204-1 y 2) (Fig. 5).

## **8. MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES DE LAS LÍNEAS A-204 CON FENOTIPO RESISTENTE**

### **8.1. Estudio mediante microscopio óptico**

La línea A-204 parental en cultivo (Figura 6) se caracterizó por un crecimiento en monocapa, estructurándose progresivamente en forma de núcleos que tienden a confluir. Su morfología celular fue espiculada aunque también aparecieron células con forma redondeada y poligonal, sobre todo cuando las células entraron en contacto en el frasco de cultivo. En general presentaron escasa cantidad de citoplasma y, por su carácter tumoral, una elevada actividad mitótica, lo que coincide con estadios de poca diferenciación.

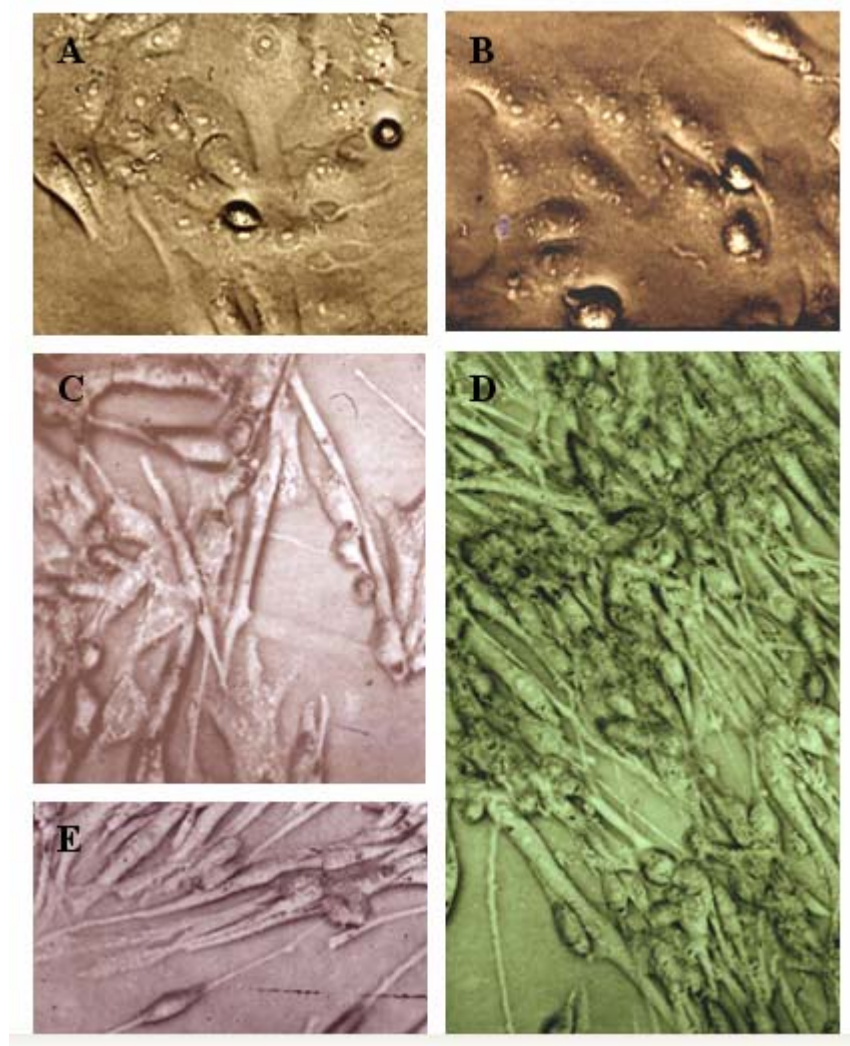
Las líneas A-204-1 y 2 con fenotipos resistentes y obtenidas a partir de la inducción de dosis clínicas de actinomicina D, presentaron similares características (Figura 6). Ambas redujeron su tasa de proliferación, aunque en su crecimiento se observó el mismo patrón de formación progresiva de

núcleos en el frasco de cultivo. Su morfología fue ligeramente más alargada que las parentales. Ocasionalmente presentaron prolongaciones adoptando formas muy elongadas e incluso estrelladas. No obstante, se siguieron observando células con el patrón morfológico típico de la línea parental.

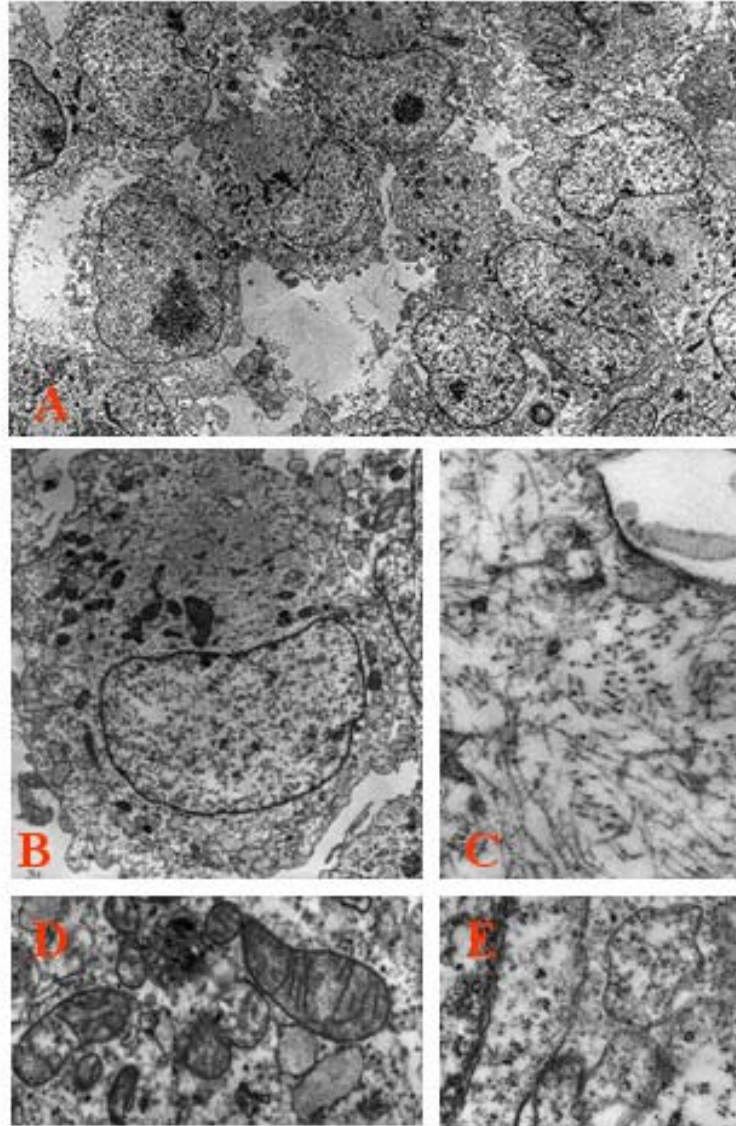
## **8.2. Análisis mediante microscopio electrónico**

La línea parental A-204 mostró características ultraestructurales de indiferenciación (Figura 7). Como signo típico de su carácter tumoral se pudo observar la presencia de grandes núcleos. Estos generalmente aparecieron lobulados y ocupando un gran porcentaje del espacio celular. El citoplasma, escaso, apareció en la mayoría de las células como una estrecha banda extremadamente clara circundando al núcleo. En él, se observó una presencia de filamentos intermedios, generalmente desestructurados, y no se pudieron detectar miofilamentos. La escasa presencia de mitocondrias y acúmulos de glucógeno fue frecuente, indicando su carácter indiferenciado. Dicho carácter también fue delatado por la gran cantidad de ribosomas libres en el citoplasma.

Las líneas A-204-1 y 2 con fenotipos resistentes presentaron modificaciones ultraestructurales en relación a la línea parental (Figura 7). Un hecho característico fue la reducción en el tamaño de sus núcleos por lo que el citoplasma apareció con mucha mayor extensión que el encontrado en la línea A-204. Estas líneas presentaron en general un mayor grado de diferenciación que las parentales, destacando la presencia de un gran "turnover" mitocondrial, con mitocondrias en perfecta formación, generalmente de gran tamaño y con crestas dilatadas. No obstante también pudieron ser observadas mitocondrias con diferentes grados de degeneración. Además, destacó la presencia de un gran aumento de la red de filamentos intermedios que ahora se encontraban estructurados. Sin embargo, no llegamos a observar claramente en ningún caso presencia de bandas Z totalmente estructuradas.



**Figura 6.** Células de A-204 parental con morfología espiculada, redondeada y poligonal (A, B). Las células A-204 con fenotipo resistente también crecieron formaron núcleos (C) aunque su morfología fue más alargada (D). Ocasionalmente presentaron prolongaciones adoptando formas muy elongadas (E).



**Figura 7.** Aspecto característico de las células A-204 parentales (A). Las células A-204 resistentes presentaron reducción en el tamaño de su núcleo (B), aumento de la red de filamentos intermedios (C), un gran “turnover” mitocondrial con mitocondrias de gran tamaño y con crestas dilatadas (D) y un retículo endoplásmico liso también dilatado (E).

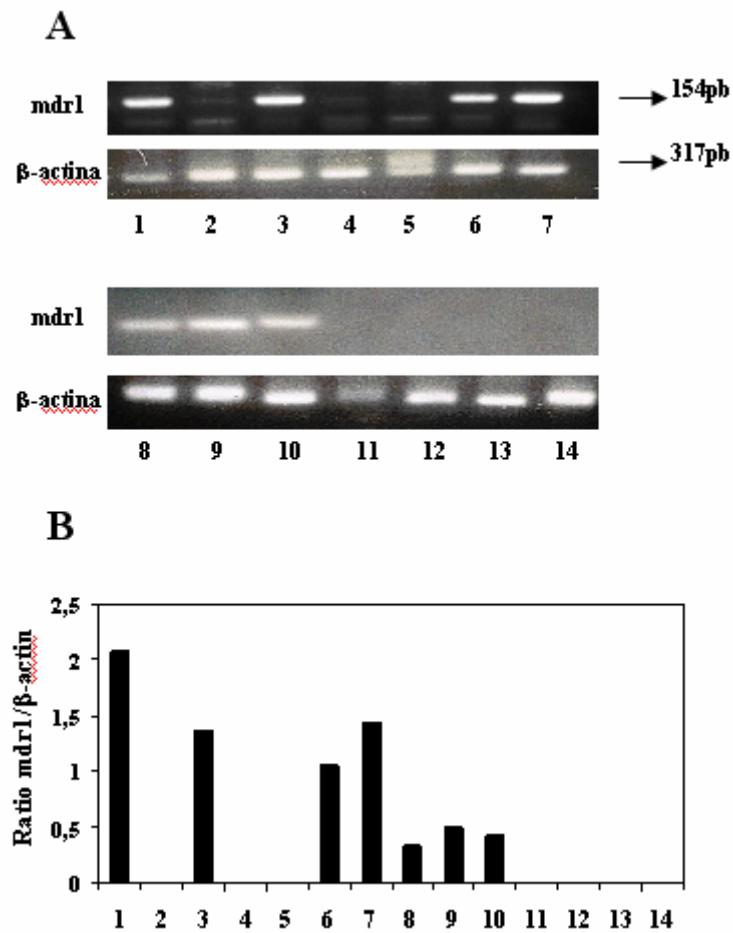


## 9. NIVELES DE EXPRESIÓN DE MDR1/P-GLICOPROTEÍNA EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS EMBRIONARIOS

Para determinar si el tratamiento convencional con citotóxicos de uso en clínica de los RMS induce modificaciones similares a las encontradas en las líneas de RMS analizadas previamente, se realizó un estudio en muestras de tejido tumoral. El grupo de estudio estuvo formado por piezas tumorales de similares características, incluyendo catorce muestras que fueron obtenidas de biopsias realizadas a pacientes que habían sido diagnosticados clínica e histológicamente como RMS de tipo embrionario. Las muestras de RMS utilizadas procedían de pacientes con una lesión primaria en diferentes localizaciones pero todos ellos habían sido sometidos a un tratamiento convencional con agentes citotóxicos (ver Material y Métodos).

Para determinar el desarrollo de resistencia mediado por *mdr1* en estas muestras y dada la escasa cantidad de ARNm obtenido, se utilizó la técnica de RT-PCR, realizando la amplificación del ADNc de *mdr1* con primers específicos lo que nos permitió detectar la presencia del ARNm de dicho gen. La utilización de primers específicos para beta-actina nos permitió determinar la integridad del ARNm total obtenido. Además, las señales de amplificación de este gen permitieron realizar estudios densitométricos para comparar los niveles de expresión de *mdr1* en las diferentes muestras de tejido analizadas.

Como se muestra en la Figura 8, de las catorce muestras de RMS analizadas, siete mostraron una clara positividad para la PCR de *mdr1* apareciendo una evidente señal en los geles. El estudio densitométrico determinó una razón entre la expresión de *mdr1* y beta-actina que se situó entre  $2.08 \pm 0.4$  en la muestra con mayor expresión y  $0.34 \pm 0.09$  en la muestra con menor expresión. Las otras seis muestras de RMS analizadas fueron negativas para la expresión de *mdr1* como demuestran la amplificación realizada mediante PCR.



**Figura 8.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión de *mdr1* en muestras de tejido de RMS embrionarios. (A) Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR en las muestras de tejido (líneas 1-14). La integridad del ARN se determinó mediante amplificación la beta-actina. (B) La bandas fueron cuantificadas tras normalización con las de beta-actina mediante densitometría.

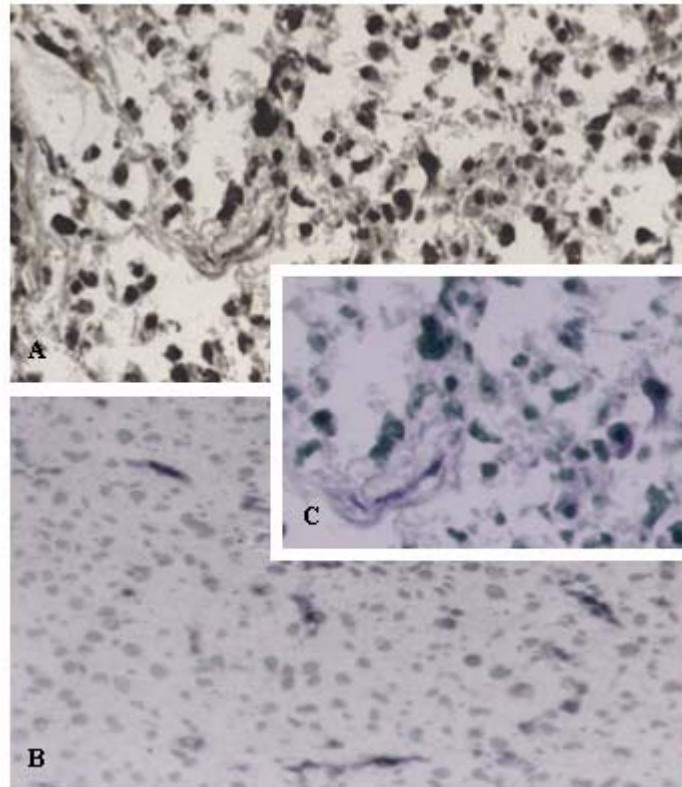
Por último, una de las muestras (Figura 8; línea 11) fue considerada dudosa para el resultado de la PCR para *mdr1* ya que la amplificación del gen de la beta-actina fue extremadamente débil, lo que sugiere una posible degradación del ARNm obtenido durante el procesamiento del tejido.

#### **10. NIVELES DE EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS EMBRIONARIOS**

Para determinar si en las muestras de tejido de RMS tratados con quimioterapia se producía modulación de la expresión de antígenos MHC, se realizó un estudio inmunohistoquímico. El análisis se centró en la determinación de la expresión del antígeno HLA de clase I, que se había observado modulado en las líneas de RMS en cultivo y se llevó a cabo utilizando los mismos anticuerpos que en los estudios realizados en las líneas tumorales (W6/32 y GRH1).

Nuestros resultados indican que de las catorce muestras de RMS embrionarios analizados, siete se pudieron considerar positivas para la expresión de HLA de clase I (Figura 9). No obstante la intensidad y el número de muestras positivas fueron muy distintos dependiendo de la expresión del gen *mdr1* previamente detectado en las mismas.

Así, en el grupo de siete muestras de RMS que presentaron positividad para la PCR de *mdr1*, cinco (71%) se mostraron claramente positivas para la expresión de HLA de clase I en los estudios inmunohistoquímicos realizados con el anticuerpo W6/32. Las otras dos muestras dentro de este grupo, fueron negativas para la expresión de este antígeno. Teniendo en cuenta la intensidad del marcaje (ver Material y Métodos), de las cinco muestras positivas para HLA de clase I, cuatro presentaron una fuerte tinción (grado 3) mientras que la muestra restante se valoró como de tinción moderada (grado 2).



**Figura 9.** Estudio inmunohistoquímico de la expresión de antígenos HLA de clase I en tejido de RMS embrionario tras la aplicación del anticuerpo W6/32. (A) Intensa expresión de antígenos HLA de clase I en una muestra de tejido (B) Detalle del marcaje celular con el anticuerpo W6/32. (C) RMS mostrando una débil expresión moléculas HLA de clase I. Magnificación, x100 y x200.

Por el contrario, el grupo de muestras de RMS que fueron negativas para la PCR de *mdr1* (seis muestras), fueron también predominantemente negativas para el marcaje de HLA de clase I con el anticuerpo W6/32. Así, solo una muestra dentro de este grupo se consideró positiva para el marcaje de los antígenos HLA, siendo considerada la intensidad de la tinción como débil (grado 1). Las cinco restantes (83%) fueron claramente negativas para el marcaje de HLA (grado 0).

En la muestra considerada dudosa para la PCR de *mdr1* por la baja amplificación de beta-actina, los resultados del estudio inmunohistoquímico demostraron una fuerte tinción para antígenos HLA de clase I (grado 3).

El estudio inmunohistoquímico también fue realizado con el anticuerpo GRH1 en todas las muestras de RMS, encontrando similares resultados a los detectados con W2/36, lo que confirmó el porcentaje y el grado de expresión de estas moléculas en el grupo de estudio.

#### **11. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA Y HLA DE CLASE I EN MUESTRAS DE TEJIDO DE RMS EMBRIONARIO**

Para determinar la posible correlación entre la expresión del gen *mdr1* y de antígenos HLA de clase I en las muestras de RMS se realizó un estudio estadístico mediante el test de Spearman Rho para poder analizar resultados paramétricos y resultados no paramétricos transformados en valorables según grados en grupos de muestras reducidos. Dicho estudio determinó una correlación positiva entre ambas variables siendo el coeficiente de correlación de 0.973.

# DISCUSIÓN

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), institución perteneciente al Instituto Nacional de la Salud de EEUU, son tres los factores fundamentales que en la actualidad definen el pronóstico de un paciente con RMS. Estos se relacionan con:

1. el empleo de una terapia óptima,
2. la localización primaria del tumor y
3. el grado y las características histopatológicas de la enfermedad.

Siguiendo los datos que arrojan los estudios realizados por el NCI, los sitios primarios de RMS con pronóstico más favorable incluyen la cabeza y el cuello (especialmente la órbita) y la localización genitourinaria (especialmente la región paratesticular y vaginal aunque excluyendo la vejiga y la próstata). Dentro de estas localizaciones, los tumores de menos de 5 cm presentan una mayor supervivencia comparados con tumores más grandes, siendo el pronóstico más reservado para aquellos con enfermedad metastásica (supervivencia a 5 años, menos de 30%).

Por otra parte, el grado de la enfermedad residual que se puede detectar después de la cirugía también está correlacionado con el pronóstico. La presencia de enfermedad residual macroscópica implica tasas de supervivencia a 5 años del 70%, en contraste con el 90% y 80% encontrado en pacientes que no tuvieron tumor residual o éste fue microscópico. Además, los pacientes con complicación probada de algún ganglio linfático regional tuvieron un resultado más precario que los pacientes que no presentaron esta complicación.

Por último, la histología del tumor influyó de forma decisiva sobre la evolución del tumor, siendo el subtipo alveolar el que se asoció con un resultado menos favorable en los pacientes cuyo sitio primario fue completamente resecado.

Dada la importancia desde el punto de vista clínico de la determinación de factores pronósticos cada vez más fiables en las diferentes patologías tumorales, en la actualidad, se investiga sobre nuevos indicadores que puedan aportar una información más precisa de la evolución de la enfermedad. Según el NCI y dentro de las investigaciones realizadas en los RMS, dos líneas están centrando los principales esfuerzos:

a) Por una parte, las características citogenéticas de estos tumores que han cobrado gran importancia ya que la determinación del contenido celular de ADN (ploidía) parece estar relacionado la respuesta de los pacientes al tratamiento. De hecho, ya existen resultados que parecen demostrar que dicha ploidía es, desde el punto de vista de la evolución de la enfermedad, especialmente importante en pacientes con enfermedad residual macroscópica después del tratamiento quirúrgico inicial. Los RMS hiperdiploides (es decir, 1.10 a 1.80 veces el contenido de ADN de las células diploides normales) presentan mejor pronóstico que los que presentaban diploidía (San Miguel-Fraile y cols., 2004)

b) Por otra parte, **la determinación de la aparición de resistencia a multidrogas en estos tumores** y en concreto, el desarrollo de resistencia mediado por la expresión de P-gp. No obstante, en esta segunda línea de investigación los resultados son controvertidos (Komdeur y cols., 2003). El estudio de la resistencia a drogas generada en los RMS se hace necesaria para conseguir el objetivo, no sólo de determinar la respuesta y por tanto el pronóstico de los pacientes frente al tratamiento convencional, sino también para determinar las posibilidades de establecer nuevos protocolos de terapia con los fármacos existentes o con los de nueva generación que ofrezcan mejores resultados. Como dice Kuttesch y cols., (1996), aunque serán necesarios numerosos estudios clínicos para determinar el papel exacto de mecanismos de resistencia como P-gp en tumores pediátricos, está claro que



su análisis es absolutamente necesario, si se quiere mejorar el pronóstico de estos pacientes.

### **Importancia de P-glicoproteína en Rabdomiosarcomas**

Han sido numerosos los estudios que han intentado determinar la importancia de la expresión de P-gp en diferentes neoplasias con el objetivo de determinar la incidencia que su expresión posee sobre el pronóstico de los pacientes. No obstante, los resultados son en muchos casos contradictorios o de difícil interpretación.

Numerosas técnicas, entre las que se encuentran la PCR, la hibridación in situ, el inmunoblotting, técnicas inmunohistoquímica y la citometría de flujo, han sido utilizadas en la determinación de esta molécula. La proporción de casos "positivos" varía de un estudio a otro siendo arriesgado establecer conclusiones generales acerca del impacto de la P-gp en el fallo del tratamiento citotóxico. Estas diferencias están determinadas por la ausencia de métodos estandarizados para cuantificar la expresión del gen *mdr1*, a lo que se suma la publicación en la mayoría de los casos de investigaciones con resultados positivos, hecho que pudiera motivar una sobreestimación en la frecuencia su expresión en algunas enfermedades malignas. En cualquier caso, la determinación de los niveles de ARNm por diferentes técnicas se sitúa como una de las aproximaciones más fiables para determinar su incidencia en diferentes alteraciones neoplásicas. En el caso concreto de los RMS, aunque la resistencia puede estar originada por diferentes proteínas, la sobreexpresión de P-gp/*mdr1* es uno de los principales mecanismos detectados, lo que sugiere su importancia como causa del fallo en el tratamiento quimioterapéutico (Komdeur y cols., 2003).

La siguiente Tabla resume de forma general los hallazgos encontrados en estudios de diferentes patologías en relación con la expresión de *mdr1*.

NEOPLASIAS TRATADAS	
<b>Alta expresión de Pgp</b>	<b>Ocasional expresión de P-gp</b>
Leucemia mieloide crónica Cáncer de colon Adenocarcinoma renal Hepatoma Feocromocitoma Carcinoma pancreático Carcinoma pulmonar de células pequeñas neurosecretor Tumor carcinoide	Leucemia linfoblástica aguda del adulto Leucemia mieloblástica aguda del adulto Linfomas no hodgkinianos Leucemia linfoide crónica Neuroblastoma Astrocitoma Mieloma múltiple
<b>Baja/ausente expresión de P-gp</b>	
Cáncer de mama Cáncer de pulmón Carcinoma vesical Leucemia mieloide crónica Cáncer de esófago Carcinoma gástrico Cáncer de cabeza y cuello Melanoma Mesotelioma Carcinoma ovárico Cáncer de próstata Sarcomas Timoma Carcinoma tiroideo Tumor de Wilms	
NEOPLASIAS TRATADAS	
<b>Alta expresión de P-gp (recaídas)</b>	
Linfomas no hodgkinianos Leucemia mieloide crónica Leucemia linfoblástica aguda Mieloma múltiple Leucemia linfoblástica aguda (niño) Leucemia linfoide crónica Neuroblastoma Cáncer de mama Feocromocitoma Carcinoma ovárico Sarcomas**(incluyendo RMS)	

Como vemos, los RMS se sitúan dentro de las patologías neoplásicas que suelen expresar bajos o nulos niveles de P-gp cuando se diagnostican, por tanto, antes del tratamiento. Una vez sometidos a terapia convencional los resultados de los diferentes estudios son contradictorios encontrando en algunos casos elevación de la expresión de mdr1 y en otros una modificación variable de dicho gen. No obstante, el desarrollo de resistencia frente a

agentes citotóxicos convencionales sigue siendo uno de los principales obstáculos en el tratamiento de estos tumores. Este hecho queda demostrado por los numerosos ensayos con nuevas drogas que intentan mejorar la respuesta de pacientes en los que ya, el tratamiento convencional, ha fracasado. En este sentido, una de las más experiencias más reciente ha sido realizada por Rodríguez-Galindo y cols. (2005) utilizando la combinación terapéutica topotecan e irinotecan. Los resultados, sin embargo, no han sido todo lo satisfactorios que se esperaban, lo que refuerza la idea de la necesidad de investigar sobre la resistencia en estos tumores con el objetivo de determinar mecanismos de bloqueo que hagan más eficaces los tratamientos actuales.

En este contexto, una posibilidad para determinar si las células de RMS son capaces de desarrollar fenotipos resistentes, es el estudio experimental mediante líneas, en las que la presión de una droga añadida al medio de cultivo, permite determinar las modificaciones celulares y entre ellas la aparición de expresión de genes de resistencia. En nuestro estudio hemos seleccionado la línea A-204, derivada de un RMS embrionario no sometido a tratamiento previo. La utilización de uno de los agentes clásicos en el tratamiento de estos tumores como es actinomicina D, ha permitido obtener un modelo experimental en donde estudiar el fenómeno de resistencia en RMS.

**Las dosis clínicas de agentes usados en el tratamiento citotóxico convencional de RMS generan resistencia. Líneas A-204-1 y A-204-2.**

La exposición de cultivos de células tumorales a dosis progresivamente mayores de antineoplásicos ha sido uno de los procedimientos habituales para la generación de líneas resistentes en donde analizar este fenómeno. Los agentes utilizados en el tratamiento clásico de los RMS como la actinomicina D, vincristina y doxorrubina, han sido unas de

las drogas más empleadas en este tipo de estudios dada su aplicabilidad en una gran variedad de patologías neoplásicas.

Los tumores sometidos analizados abarcan una gran variedad. Así, mediante el uso de doxorubicina se han podido obtener líneas de adenocarcinoma de colon (LoVo/DX) de 25 a 30 veces más resistente a dicho fármaco que la línea parental (Grandi y cols. 1986) o líneas derivadas de melanoma que han resultado ser hasta 200 veces más resistentes (B16VDXR) que la línea original y sensible (Supino y cols., 1986). En células derivadas de carcinoma humano (KB) se han observado aumentos de la resistencia a doxorubicina de hasta 97 veces (KB-A1) (Roninson y cols., 1986). Curiosamente, esta misma línea inducida con otros agentes como vinblastina, ha dado lugar a sublíneas hasta 213 veces más resistentes (Roninson y cols., 1986).

Sabemos que algunos agentes pueden inducir grados de resistencia mucho más elevados que otros. El fármaco colchicina, utilizado en cultivos de líneas de ovario de hámster y de carcinoma humano, genera sublíneas (como KB-C4) que son hasta 1750 más resistentes que la línea parental (Ling y cols., 1983). Esta resistencia puede alcanzar las 2500 veces, tal y como se ha podido comprobar en la línea derivada de macrófagos de ratón denominada J7 CI-100 (Slovak y cols., 1988). Otro caso espectacular es el del agente vincristina, también de uso habitual en RMS, y que utilizado en líneas de adenocarcinoma de ovario humano (IGROVI) provoca un aumento de resistencia de hasta 800 veces (Benard y cols., 1989).

Estos datos sugieren que el grado de resistencia inducido depende no sólo del agente utilizado sino también del tipo celular sobre el que actúa, aunque las causas de esta variabilidad no son todavía conocidas. Este hecho es especialmente notable en la droga actinomicina D, un agente de elección en el tratamiento de los RMS y utilizado en nuestro estudio para inducir resistencia en la línea A-204.

Thisler y cols. (1992), consiguieron generar una línea de neuroectodermo primitivo (DAOY) resistente a actinomicina D, que resultó ser 10 veces más resistente que la línea parental y en este caso sensible a la droga. Por otra parte, el mismo agente utilizado para inducir resistencia en líneas derivadas de cáncer de pulmón de hámster permitió obtener clones (DC-3F/ADX) 2450 veces más resistentes a actinomicina D, habiendo sido cultivadas con concentraciones similares a las de la línea DAOY (Biedler y cols., 1983). La inducción de la línea A-204 de RMS con actinomicina D nos ha permitido obtener dos líneas resistentes, A-204-1 y 2, que se mostraron 34 y 96 veces más resistentes que la línea parental A-204. Estos datos apoyan la hipótesis de que actinomicina D puede provocar diferentes grados de resistencia dependiendo de la concentración utilizada para la inducción, lo que extrapolado a nivel clínico permitiría, al menos en parte entender, los diferentes niveles de resistencia encontrados en los estudios con pacientes afectados de diferentes tumores en los que su tratamiento incluye este agente como droga de elección a diferentes concentraciones.

Dentro del mismo tipo histológico de tumor, la acción de actinomicina D en cuanto a la generación de resistencia parece poseer un cierto patrón dosis-dependiente. Cuando se compararon los niveles de resistencia de las líneas A-204-1 y 2 obtenidas mediante el uso de dosis clínicas del fármaco, con la resistencia observada en otras líneas también derivadas de RMS embrionario, pero obtenidas con dosis subclínicas del agente, pudimos observar una diferencia relevante. Así, el grado de resistencia registrada en las líneas RD-DAC y TE-32.7-DAC, obtenidas mediante la exposición a dosis subclínicas de actinomicina D fue significativamente menor que el de la línea resistente A-204-2. Parece pues, que al menos en RMS, la concentración de actinomicina D a la que se exponen las células tumorales, guarda una cierta relación con los niveles de resistencia encontrados.

Para confirmar este hecho, las resistencias de A-204-1 y 204-2 fueron comparadas con las detectadas en una línea que había sido sometida a la exposición de actinomicina D in vivo, la línea RMS -GR. Esta línea debería presentar niveles de resistencia mayores que los encontrados en la línea RD-DAC y TE.32.DAC y similares a los encontrados en las líneas A-204-1 y A-204-2. Efectivamente la línea RMS-GR presentó una  $IC_{50}$  para actinomicina D proporcionalmente mayor que la observada en las dos líneas inducidas con dosis subclínicas. Estos datos vienen a confirmar la relación entre la dosis empleada y los niveles de resistencia inducidos.

Sin embargo, la  $IC_{50}$  de RMS-GR también fue mayor que las de las líneas inducidas con niveles clínicos del fármaco, representando prácticamente el doble de la encontrada en la línea A-204-2 y más de cinco veces que la presentada por A-204-1. Aunque este dato parece contradictorio, debemos tener en cuenta que la línea RMS-GR fue expuesta no sólo a la droga actinomicina D, sino también a los agentes vincristina y doxorubicina dentro de los ciclos de terapia que recibió el paciente afecto de RMS del que fue obtenida. La acción combinada de varios agentes puede inducir una mayor expresión de P-gp u otros mecanismos de resistencia (Gruber y cols., 1994) que probablemente pueden explicar esta diferencia en el nivel de resistencia.

#### **La expresión de P-gp implica la aparición de resistencia cruzada al tratamiento convencional de los RMS**

Los estudios realizados en las líneas A-204-1 y 2 demuestran claramente la presencia de un aumento en la resistencia a drogas a las que las células tumorales no habían sido expuestas. El análisis realizado con las drogas vincristina y doxorubicina, dos clásicos agentes utilizados en la terapia convencional de los RMS, determinó un aumento en el grado de resistencia para vincristina de 37 y 88 veces en 204-1 y A-204-2 respectivamente, en comparación a la presentada por la línea parental A-

204. Un aumento ligeramente menor fue detectado para el agente doxorubicina, situándose los incrementos de resistencia en prácticamente 23 y 64 veces en ambas líneas, respectivamente.

Este fenómeno denominado resistencia cruzada o “cross”-resistencia (Hofsli, 1992) supone una dificultad añadida en el tratamiento de los RMS dado que dicho fenómeno implica una falta de actividad antitumoral no sólo del agente utilizado en el tratamiento sino también de otros agentes relacionados estructuralmente con el usado e incluso con agentes estructuralmente distintos. En realidad, el fenómeno de resistencia cruzada afecta fundamentalmente a fármacos de la familia de los vinca-alcaloides, epipodofilotoxinas, antraciclinas y actinomicina D y ha sido frecuentemente observado en los estudios de resistencia a drogas. Tres agentes de uso habitual en RMS aparecen frecuentemente asociados a este fenómeno: adriamicina, vincristina y D-actinomicina.

Así, estudios realizados con estos tres agentes en células de cáncer de pulmón de hámster (DC-3F), demostraron que, aunque los mayores niveles de resistencia se producían frente al fármaco inductor, también se desarrollaba una importante resistencia a los otros dos (Biedler y cols., 1983). Bhalla y cols. (1985) describen en la línea HL-60/AR (línea de leucemia humana) resistente a adriamicina, una clara resistencia cruzada a vincristina, actinomicina D y vimblastina. Como vemos, dicho fenómeno no parece tejido- específico y así, en otros tipos tumorales como el carcinoma de colon (línea LoVo/DX), la inducción de resistencia con doxorubicina, provoca resistencia para este agente pero también para vincristina y para actinomicina D (Grandi y cols., 1986). Curiosamente, estas dos últimas líneas no presentaron “cross”-resistencia, en el caso de la primera para arabinósido C y en el caso de la segunda para antimetabolitos del tipo del metrotexato ni con agentes alquilantes como la mitomicina C. No obstante, el patrón de

resistencia cruzada no parece seguir una norma definida y se desconocen los mecanismos por los que dicho fenómeno se rige.

Un ejemplo de esta última afirmación lo encontramos en la línea B16VDXR (melanoma humano) que presenta resistencia a doxorubicina, droga con la que se indujo, y muestra resistencia cruzada con algunos derivados de esta molécula como 4'-epi-doxorubicina. Sin embargo, la misma línea no presentó resistencia frente a 4'-deoxi-doxorubicina ni 4'-deoxi-4'-iodo-doxorubicina, hecho que aún no posee ninguna explicación, dada la similitud estructural que poseen las drogas mencionadas. Otro ejemplo de la gran variabilidad de la resistencia cruzada lo encontramos en las líneas de osteosarcoma MOS inducidas a la resistencia con el agente adriamicina (MOS/ADR1 y MOS ADR2) (Takeshita y cols., 1996). La línea MOS/ADR1 se mostró resistente a vincristina, vinblastina, etopósido, bleomicina, mitomicina C y actinomicina D, pero siguió mostrando sensibilidad a dacarbacina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo. La línea MOS/ADR2 mostró un espectro de resistencia parecido, lo que indica un cierto patrón tisular de resistencia en estos tumores, aunque con niveles más elevados de resistencia. En otras líneas, como L1210 derivadas de leucemia e inducidas a la resistencia con vincristina, la cros-resistencia se manifestó con los agentes vinblastina, actinomicina D, mitomicina C, doxorubicina y ciclofosfamida (Bohacova y cols., 2000).

A pesar de la variabilidad en el grado de resistencia cruzada que, como vemos, varía en función de la droga y el tejido tumoral analizado, en el caso de los RMS, el patrón de agentes afectados por este fenómeno parece, hasta donde hemos podido estudiar, constante. Los estudios realizados en la línea RMS-GR determinó la presencia de resistencia cruzada para vincristina y doxorubicina. En este caso las  $CI_{50}$  determinadas para estos dos fármacos demostraron ser más elevadas que las detectadas en A-204-1 y 2, lo que



puede en parte ser explicado por la exposición in vivo de esta línea a los dos agentes citados. Por el contrario, el estudio comparativo de la resistencia cruzada por líneas expuestas a menores dosis de actinomicina D (RD-DAC y TE.32.7-DAC) demostró que el patrón de resistencia cruzada se mantenía en las líneas de RMS, apareciendo resistencia cruzada a vincristina y doxorubicina, pero también, que esta resistencia era en general de menor grado al menos que la presentada por A-204-2, lo que sugiere una inducción dosis dependiente de resistencia cruzada para las líneas de RMS tratadas con actinomicina D.

Siguiendo el patrón de resistencia ya descrito por Beck y cols., 1979, las líneas resistentes derivadas de A-204 y la línea RMS-GR presentaron una mayor resistencia a la droga usada para la selección (actinomicina D) que a las drogas vincristina y doxorubicina. Dado que la resistencia fue mediada por la inducción de P-gp, este patrón podría ser explicado por las modificaciones específicas que actinomicina D puede inducir en esta molécula. Recientemente, se ha demostrado como la presión a la que es sometida una célula en cultivo en presencia de un agente citotóxico, puede provocar modificaciones en discretas regiones del gen *mdr1* incluyendo la zona del promotor (Baker y cols., 2005). A nivel proteico, Choi y cols. (1988), ya encontraron diferencias entre la P-gp expresada por las líneas KB inducida a la resistencia por vimblastina y por colchicina. La modificación en tres de las bases de la secuencia génica de *mdr 1*, que modificaba un aminoácido entre las dos proteínas y que era provocado por la presión de selección de los diferentes fármacos, era suficiente para que la molécula tuviera más afinidad frente al agente inductor y por tanto presentara menor resistencia frente a otros. De hecho, estas modificaciones no son infrecuentes tal y como ha sido observado por Devine y cols., 1992 en una línea de cáncer de pulmón (DC-F3) resistente a actinomicina D. En esta línea P-gp presentaba una mutación que afectaba a dos aminoácidos del sexto dominio transmembrana. La transfección de esta alterada P-gp mediante el vector

pLK444 (promotor pHbeta Apr-1-neo) para inducir una expresión eficaz de la proteína, provocaba en las células una resistencia cruzada diferente a la obtenida con la P-gp sin mutaciones. Aunque no podemos confirmarlo, posiblemente actinomicina D induzca modificaciones en P-gp que le confieran un patrón típico de resistencia cruzada. Además, este fenómeno podría estar asociado a la concentración de droga inductora utilizada, ya que las líneas RD-DAC y TE.32.7-DAC mostraron una resistencia a doxorubicina y vincristina mayor que a actinomicina D. Este hecho también ha sido observado en otras líneas resistentes como KB-V1 y KB-8511 que, habiendo sido seleccionadas con vimblastina y con colchicina respectivamente, presentan una mayor resistencia a doxorubicina y vimblastina (Roninson y cols., 1986).

En cualquier caso, la diferencia en los patrones de “cross”-resistencia encontrada en diferentes líneas tumorales en las que el agente inductor ha sido el mismo, no tiene por el momento una explicación satisfactoria (Shoemaker y cols., 1983). Líneas seleccionadas con el mismo agente pero en diferentes condiciones pueden originar fenotipos diferentes de resistencia (Ling y cols., 1983). Como sugieren algunos autores, el complejo patrón de “cross”-resistencia puede resultar de diferentes alteraciones de membrana, provocadas por las diferentes “presiones” de selección usadas para obtener el fenotipo resistente (Bhalla y cols., 1985). Nuestros resultados apoyan la teoría de que no existe un patrón estándar que permita determinar qué grado de resistencia y qué tipo de resistencia cruzada se va a producir en un tumor tras el tratamiento quimioterapéutico, haciendo de la combinación de las drogas terapéuticas una cuestión que debería ser individualizada para cada paciente.

### **P-glicoproteína como mecanismo de resistencia en RMS**

El principal mecanismo que induce resistencia al agente actinomicina D es la expresión del gen *mdr 1* que codifica para P-gp. Este mecanismo de

resistencia fue descrito en líneas de cáncer de pulmón en las que los fármacos vincristina, daunorrubicina y actinomicina D, se mostraban ineficaces (Biedler y cols., 1983). En ellas, una proteína de 150 Kd identificada como una glicoproteína de membrana con una acción de “bomba de eflujo” producía la expulsión del fármaco del interior de la célula (Juliano y Ling, 1976). Roninson y cols. (1986) estudian la familia de genes que codifican para P-gp y que son denominados MDR. Poco después, Ueda y cols. (1987) denominan *mdr 1* al gen responsable del fenotipo MDR en líneas celulares humanas. Desde entonces, han sido muchos los tipos tumorales en los que se ha detectado la presencia de P-gp como mecanismo de resistencia a drogas.

En la Tabla siguiente se indican algunos de los tipos histológicos en los que el desarrollo de líneas ha sido fundamental para la detección de expresión de *mdr 1* tras la inducción mediante diferentes protocolos. Sería demasiado extenso y fuera del objetivo de nuestro estudio, comentar todas las líneas celulares en las que P-gp posee una función determinante en el desarrollo de resistencia. No obstante, la gran cantidad de líneas y tipos de tejido tumoral en los que se ha detectado, indica la importancia que este mecanismo parece tener en fracaso de la quimioterapia aplicada a patologías tumorales.

Experiencias muy recientes siguen demostrando que las líneas celulares son un buen modelo para analizar el fenotipo MDR y que la expresión de P-gp sigue siendo uno de los principales mecanismos de resistencia en cáncer. Bohacova y cols. (2005) han demostrado la importancia de P-gp en la resistencia generada frente a vincristina, vinblastina, actinomicina D, mitomicina C, doxorubicina y ciclofosfamida en leucemias, utilizando la línea L1210/VCR. Resultados similares han sido obtenidos por Tognon y cols. (2005) en cáncer de ovario tras la realización de experiencias con la línea IGROV-1/APL. En cáncer de mama la

exposición de la línea MCF-7 a doxorrubina (MCF7-R) induce la aparición de P-gp (Stierle y cols., 2005) al igual que ocurre en la línea de mieloma 8226/R5 (Buzzedo y cols., 2005). Patología tan frecuentes como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, también expresan P-gp como se ha podido observar en las líneas Ma-10, Ma-31 y Ma-46 (Ikuta y cols. 2005).

Tipo de cáncer	Línea	Tipo de cáncer	Línea
<b>Cáncer de mama</b>	BR-MCF7 UK-MCF7-ADR-RES BR-MDA-MB-231 ME-MDA-MB-435 BR-T-47D BR-BT-549 BR-HS578T	<b>Cáncer de pulmón</b>	LC-NCI-H23 LC-A549 LC-EKVX LC-HOP-92 LC-NCI-H460 LC-NCI-H522 LC-HOP-62 LC-NCI-H322M LC-NCI-H522 LC-NCI-H226
<b>Cáncer de ovario</b>	OV-OVCAR-4 OV-OVCAR-5 OV-OVCAR-8 OV-SK-OV-3 OV-IGROV1 OV-OVCAR-3 OV-OVCAR-4	<b>Cáncer de colon</b>	CO-HCT-116 CO-HCT-15 CO-HT29 CO-HT29 CO-KM12 CO-SW-620 CO-HCC-2998 CO-COLO205
<b>Sistema nervioso central</b>	CNS-SF-268 CNS-SF-295 CNS-SF-539 CNS-U251	<b>Melanoma</b>	ME-M14 ME-LOXIMVI ME-MALME-3M ME-SK-MEL-5 ME-SK-MEL-28 ME-SK-MEL-2 ME-UACC-257 ME-UACC-62
<b>Carcinoma renal</b>	RE-TK-10 RE-A498 RE-786-0 RE-CAKI-1 RE-UO-31 RE-SN12C	<b>Leucemia</b>	LE-SR LE-RPMI-8226 LE-SR LE-CCRF-CEM LE-MOLT-4 LE-RPMI-8226 LE-CCRF-CEM
<b>Cáncer de próstata</b>	PR-DU-145 PR-PC-3	<b>Glioblastoma</b>	CNS-SNB-19 CNS-SNB-19

Estos resultados han llevado al estudio de patologías tumorales en las que los mecanismos de resistencia son todavía desconocidos como es el caso del cáncer gástrico, el carcinoma hepatocelular y el carcinoma de útero.

Utilizando las líneas resistentes SGC7901/VCR, HepG2 y una línea de sarcoma uterino, se ha podido confirmar la aparición de P-gp como una de las posibles explicaciones en el fracaso del tratamiento de estas patologías (Tang y cols., 2005; Han y cols., 2005; Hua y cols., 2005).

Recientemente, estudios realizados en sarcoma de Ewing, tumor que afecta fundamentalmente a huesos pero que también puede comprometer a músculos y tejido blando que rodea el tumor, determinan que la expresión de P-gp puede ser la base de su resistencia. Esto es lo que afirman Manara y cols. (2005) en un estudio realizado sobre una línea derivada de este tipo tumoral (la línea ET-743) tras la inducción de resistencia y la obtención de tres líneas con fenotipo resistente denominadas TC/ET 3 nM, TC/ET 6 nM y TC/ET 12 nM. En el caso de los RMS, experiencias previas demuestran que la aparición de una amplificación del gen *mdr1* en líneas cultivadas con bajas dosis de actinomicina D pueden ser la base para la sobreexpresión de P-gp (Prados y cols., 1996). No obstante, dicha amplificación no parece ser necesaria en todas las líneas celulares resistentes para la aparición de elevados niveles de ARNm de este gen. Así, mientras que en líneas derivadas de células de hámster y resistentes a adriamicina y colchicina (LZ y C5 respectivamente) se ha observado amplificación de *mdr1* (Gros y cols., 1986), en otras la expresión de *mdr1* no se encuentra relacionada con el grado de amplificación de este gen. Tal es el caso de algunas líneas de melanoma resistentes a vincristina, vinblastina y colchicina (Lemontt y cols., 1988) y con resistencia cruzada a vincalcaloides, antraciclinas, colchicina y actinomicina D, en las cuales no se pudo observar amplificación génica. Además, líneas celulares resistentes a diferentes fármacos derivadas de neuroblastoma, carcinoma de ovario y carcinoma de pulmón (SH-SY5Y/VCR, SW1573/500 y 2780AD respectivamente), que presentaban distintos niveles de amplificación de *mdr1* (30, 2 y 6 veces respectivamente), muestran niveles de expresión de ARNm que no concuerdan con las copias

amplificadas del gen, lo que apoya aún más la idea de la no correlación entre amplificación y sobreexpresión.

En nuestro caso, las líneas A-204-1 y A-204-2 presentaron un aumento notable en la expresión del gen *mdr1*. Tras realizar estudios de Northern blot y valorar la intensidad de las bandas mediante densitometría, el incremento en la expresión fue de aproximadamente 7 veces (7 para A-204-1 y 6.8 para A-204-2). Estos rangos de aumento de expresión se encuentran dentro de los observados en otras líneas resistentes. Por ejemplo, en líneas de cáncer de colón resistentes en las que se valoró la expresión de *mdr 1*, al igual que nosotros, por análisis de las bandas obtenidas en Northern blot de *mdr1* en relación a las bandas de beta-actina, se encontraron aumentos de entre 4.8 y 26.3, en la línea SW498 y, entre 2.1 y 22 en la línea LoVo (Boiocchi y Toffoli, 1992).

Cuando los incrementos de A-204-1 y 2 fueron comparados con los observados en otras líneas de RMS, pudimos comprobar una relación entre las concentraciones de fármacos utilizados y los niveles de incremento de expresión de *mdr1*. Así, las líneas RD-DAC y TE.32.7-DAC, inducidas con niveles subclínicos de actinomicina D, presentaron menores aumentos de expresión, como demuestra su análisis densitométrico (4.5 y 4.7 respectivamente). Por el contrario, la línea obtenida tras la exposición in vivo a diferentes agentes quioterapéuticos (RMS-GR), fue la que presentó unos mayores niveles de ARNm de *mdr1*, que se situaron, tras la normalización con la señal de beta-actina, en un valor de 11. Este mayor aumento (en relación a las líneas A-204-1 y 2) probablemente pueda ser explicado por la mayor "presión" farmacológica a la que estuvo sometida esta línea ya que, además de ser expuesta a actinomicina D, entró en contacto con los agentes vincristina y doxorrubina dentro del tratamiento combinado al que fue sometido el paciente. Parece pues que, a pesar de la variabilidad encontrada en diferentes tipos celulares en cuanto a la expresión de P-gp, en las líneas

de RMS existe un cierto patrón de comportamiento que relaciona la dosis de droga utilizada con los niveles de expresión de mdr1.

### **El fenotipo de resistencia en RMS se acompaña de modulaciones en la expresión de antígenos MHC**

Las implicaciones biológicas que supone la expresión de P-gp en tumores del tipo de los RMS están siendo muy discutidas, sobre todo, en relación a la capacidad de esta proteína de inducir modulaciones en la expresión de otros antígenos, entre los que podemos incluir las moléculas MHC (Eralp y cols., 2002; Gallego y cols., 2004; Staibano y cols., 2004).

Los tejidos musculares, en general, se caracterizan por presentar una débil o nula expresión de HLA de clase I (Daar y cols., 1984). Los estudios realizados en biopsias intraoperatorias (Suitters y cols., 1987) y en líneas establecidas a partir de músculo estriado normal (HS 848) (Fernández y cols., 1991) lo confirman. En sus derivados tumorales, los RMS, este patrón de baja expresión de moléculas MHC parece mantenerse. De hecho, nuestros resultados en la línea parental A-204 demuestran una débil presencia de estos antígenos, lo que coincide con los hallazgos en las otras líneas de RMS embrionario.

Sin embargo, la inducción a la resistencia y la aparición de P-gp en las membranas de estas células supone un cambio significativo en los niveles de expresión de HLA de clase I. Utilizando la técnica de fluorocitometría de flujo y mediante dos anticuerpos monoclonales distintos (W6/32 y GRH1) que reconocen dicha molécula, hemos podido determinar un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia de las líneas resistentes A-204-1 y 2. Dicho incremento fue de un 111% y un 113% en A-204-1, dependiendo del anticuerpo utilizado (W6/32 y GRH1, respectivamente) y de un 137% y un 80% en la línea A-204-2. Estos datos determinan inequívocamente, una modulación significativa en el patrón antigénico de estas células.

Para determinar si estas modulaciones eran constantes en RMS con fenotipo resistente, comparamos los datos obtenidos en A-204-1 y 2 con los de las otras líneas. El estudio fluorocitométrico con el anticuerpo W6/32 realizado sobre la línea con fenotipo resistente TE.32.7-DAC demostró un incremento en la media de intensidad de fluorescencia de un 82% en relación a la línea parental. Comparado este incremento con los cambios observados en las líneas resistentes RD-DAC y TE.32.7-DAC (incremento del 68% y 82% respectivamente y utilizando W6/32) las modulaciones son significativamente mayores, lo que sugiere una relación entre los niveles de expresión del ARNm (que eran mayores en A-204-1 y 2) y el grado de modificación en la expresión de estos antígenos. Esta hipótesis debería implicar que la línea RMS-GR, con niveles superiores de expresión de *mdr1* a las de las líneas anteriormente citadas, debería presentar las mayores modificaciones en los niveles de expresión de antígenos HLA de clase I, hecho éste que pudo ser demostrado mediante análisis de FACScan tanto con el anticuerpo W6/32 como con GRH1.

Pero *¿cómo puede P-gp modular los niveles de expresión de antígenos MHC?*. La respuesta a esta pregunta no está aún del todo dilucidada. Sabemos que en el control de la expresión de las moléculas MHC están implicados diferentes transportadores de membrana que parecen actuar durante el proceso de diferenciación celular. Su actuación modula la expresión de estos antígenos, modulación que de alguna forma discurre paralela a la maduración celular (Harris y cols., 1993). Entre estos transportadores se encuentran las moléculas TAP1 y TAP2. Estudios de la estructura de P-gp determinan su similitud a la de los citados transportadores, por lo que se ha sugerido que P-gp podría actuar, como aquellos, acumulando gran cantidad de péptidos en vesículas con la finalidad de ser transportados hacia la membrana (Sharma y cols., 1992; Ejendal y Hrycyna, 2002). Por otra parte, está demostrado que uno de los factores que induce la modificación en la expresión de antígenos HLA es la cantidad y el



tipo de pequeños péptidos que se localizan en el retículo endoplasmático del citoplasma celular (Neefjes y cols., 1993). Estos hechos han llevado a sugerir que la acción de P-gp transportando fragmentos de proteínas hacia el retículo endoplasmático podría provocar cambios en los niveles de expresión de HLA (Ritz y cols., 2003).

Tal y como muestran nuestros resultados, aumentos en la expresión de P-gp, que implicarían un mayor tráfico de péptidos hacia estas estructuras, coinciden con un aumento en los valores de HLA detectados de por citometría de flujo. Estos resultados son apoyados por otros que, en la misma dirección, han sido observados en diferentes tipos celulares. Así, Zochbauer y cols. (1997), detectan un aumento en la expresión de P-gp acompañado de modulaciones en los niveles de antígenos MHC en células derivadas de leucemia. Una clara correlación entre la expresión de P-gp y moléculas MHC ha sido determinada por estudios clínicos realizados en pacientes afectados de leucemia mieloide aguda (Hirose y cols., 1999). Recientemente, el fenotipo resistente y mediado por mdr 1 detectado en la línea de leucemia L1210, ha sido relacionado con aumentos de hasta cuatro veces en la expresión de HLA de clase I (Martin-Orozco y cols., 2005). Podría argumentarse que determinadas células hemáticas, como los linfocitos, expresan constitutivamente dicha molécula. Sin embargo, en tumores ya no hematológicos sino de tipo carcinomatosos, como son las neoplasias de colon y de mama, la citada correlación también ha sido demostrada (Masci y cols., 1995).

Aunque existen pues, modificaciones de los antígenos HLA de clase I en todas las líneas de RMS con aumento en la expresión de P-gp, hecho que sugiere una relación entre ambos fenómenos, esta relación podría ser casual y no causal. En estas circunstancias, un bloqueo en la acción de P-gp en las líneas resistentes debería provocar, si ambos fenómenos están correlacionados, un descenso en los niveles de expresión de HLA de clase I.

Con el objetivo de determinar esta correlación se llevaron diferentes estudios con el agente verapamilo.

El verapamilo es un de los diferentes agentes descritos capaz de bloquear la acción de P-gp (Avendano y cols., 2002). Su utilización en dosis no tóxicas en los cultivos de las células de RMS aportó a nuestra investigación dos resultados fundamentales: en primer lugar, corroboró que la resistencia observada en las líneas tumorales era debida a la presencia de P-gp; en sgundo lugar, que la expresión de esta proteína era la causa de las modulaciones en los niveles de expresión de HLA de clase I.

Las primeras experiencias se centraron en demostrar que realmente, la expresión de P-gp en RMS provocaba una disminución en la acción no sólo de la droga inductora, actinomicina D, sino también de otras drogas de uso habitual en el tratamiento de estos tumores. Así, las experiencias de citotoxicidad realizadas en los cultivos tras una exposición a 10  $\mu$ M de verapamilo demostraron una reducción significativa del grado de resistencia, o lo que es lo mismo, un aumento en la capacidad citotóxica de las drogas, en todas las líneas testadas. En A-204-1 tratada con verapamilo, el incremento de la acción citotóxica de actinomicina D, vincristina y doxorubicina fue de aproximadamente 12, 6.3 y 39 veces respectivamente, en relación a la misma línea sin tratamiento con el agente. En la línea A-204-2, dicho incremento fue de 20, 8 y 51.6 veces para los mismos fármacos. Como era de esperar, estos incrementos fueron no significativos en la línea parental A-204. Similares reducciones del grado de resistencia fueron encontradas en las líneas RD-DAC y TE-32.7-DAC, en las que, como en el caso de las líneas resistentes derivadas de A-204, el mayor incremento en la citotoxicidad fue detectado para los estudios con actinomicina D y doxorubicina. El parecido aumento de citotoxicidad encontrado en estas líneas para los fármacos testados, a pesar de que, como ya vimos, presentaban diferentes niveles de expresión de P-gp, puede ser explicado

por el hecho de que las concentraciones utilizadas de verapamilo son capaces de inhibir la P-gp existente.

No obstante, el patrón de cambios en el grado de resistencia de la línea RMS-GR fue distinto ya que, aunque se observó un aumento de la citotoxicidad de actinomicina D, vincristina y doxorubicina, el cambio más significativo, a diferencia de las otras líneas, fue observado en la acción de vincristina (un aumento en su citotoxicidad de 77 veces), hecho éste que podría ser en parte explicado, por las características de esta línea celular.

Pero además, los estudios realizados con verapamilo sobre las líneas de RMS nos han permitido confirmar la relación causa efecto existente entre la aparición de expresión de P-gp y la modulación en la expresión de antígenos de membrana como HLA de clase I. Tras el bloqueo de P-gp con verapamilo, tanto la línea A-204-1 como la línea A-204-2 sufrieron un drástico descenso en su expresión. En valores de media de intensidad de fluorescencia, determinadas mediante fluorocitometría de flujo, dicha reducción se situó en un 46.5 y 52.6%, en la primera línea y en un 57.3% y un 62.9% en la segunda, dependiendo de si el estudio fue realizado con el anticuerpo W6/32 o GRH1. Estos resultados indican claramente que el bloqueo de la acción de P-gp permite una recuperación en los niveles de HLA de clase I en la membrana celular. El estudio comparativo con las otras líneas resistentes arrojó similares resultados, encontrando en todas ellas aumentos en los niveles de expresión de estos antígenos. Además, algunos estudios apuntan hacia que P-gp no sólo es capaz de actuar sobre los niveles de HLA de clase I, sino que también puede afectar a los de clase II. Así ocurre en los estudios realizados por Seldack y cols. (1997) sobre la línea HL-60/VC. No obstante, este último extremo no ha sido recogido en nuestra investigación.

### **Las líneas resistentes A-204-1 y 2 presentan signos de diferenciación**

Es un hecho conocido que la resistencia mediada por *mdr* se suele asociar a diferenciación de las células tumorales. Así lo describió Bates y cols. (1989) en líneas de neuroblastoma (SK-n-sh) que presentaban una expresión de este gen 20 veces superior a la de la línea parental.

En RMS, trabajos previos han demostrado que la presencia de bajas dosis de actinomicina D en cultivo induce signos de diferenciación muscular (Melguizo y cols., 1996). Como ha observado Leuschner y cols. (2002), el desarrollo de un fenotipo resistente en células de RMS, provoca un aumento el grado de diferenciación que se refleja en la modulación de la expresión de antígenos marcadores de este proceso (desmina, vimentina, actina, etc). En nuestro caso, las líneas resistentes A-204-1 y 2 también presentaron también modificaciones morfológicas dque indicaban diferenciación. Probablemente, en las células rhabdomyosarcomatosas, el mecanismo molecular de diferenciación miogénica pueda ser todavía activado, aunque no se pueda conseguir una diferenciación plena hacia célula muscular madura (Nigro y cols., 2004). No obstante, la aparición de filamentos intermedios estructurados, la reducción en el tamaño nuclear y, sobre todo, el aumento en el número de mitocondrias, que ahora aparecen aumentadas de tamaño y con crestas dilatadas, indican un mayor grado de diferenciación de las líneas resistentes. De hecho, modificaciones similares han sido observadas en células de RMS humano sometidas a tratamiento con ácido retinóico y con prostaglandina E (Gabbert y cols. 1988; Garvin y cols., 1986).

No sabemos si estos cambios en el nivel de diferenciación celular pueden tener relevancia desde el punto de vista clínico. En general, una de las posibles vías de tratamiento antitumoral es la inducción por diferentes mecanismos de lo que se ha dado en llamar "*terapia de diferenciación*" (Isoldi y cols., 2005). No obstante, algunos autores ya han descrito como RMS bien

diferenciados parecen presentar un mayor número de recurrencias empeorando el pronóstico de los pacientes (Staibano y cols., 2004; Leuschner y cols., 2001). De confirmarse esta teoría, nuestros resultados apuntarían a que la capacidad de desarrollar resistencia por parte de las células de RMS supone, no sólo una dificultad en su tratamiento sino además, la posible causa del aumento de recurrencias en estos pacientes.

### **Resultados experimentales y resultados clínicos**

La utilización de líneas celulares para realizar trabajos experimentales permite un control casi completo de las variables que condicionan nuestras experiencias. El sistema experimental basado en líneas de RMS nos ha permitido desarrollar un modelo en el que, utilizando niveles de drogas similares a los utilizados in vivo, hemos podido analizar algunos aspectos del desarrollo del fenómeno de resistencia en estos tipos de tumores. Sin embargo, estos resultados no son del todo extrapolables a la clínica dado que, en este último caso, el desarrollo de fenómenos de resistencia a drogas está condicionado por el ambiente tisular en el que se desarrollan las células tumorales, ambiente obviamente muy distinto al de los medios de cultivo que utilizamos en los modelos experimentales y que implica, como en toda experimentación in vivo, factores no controlables en el proceso experimental.

Desde el punto de vista de la experimentación en cultivos hemos podido demostrar como se genera la resistencia a actinomicina D en células RMS, cuales son los niveles de expresión de P-gp y como existe una correlación con algunas modificaciones antigénicas, en este caso de antígenos HLA. Estos resultados pueden ser de gran relevancia desde el punto de vista terapéutico y pronóstico y ya han sido relacionados con al menos dos hechos que parecen ser trascendentes en el curso de la enfermedad:

\*desde el punto de vista pronóstico, la capacidad de producir metástasis y

\*desde el punto de vista terapéutico, la respuesta a las expectativas que ha abierto el novedoso uso de las técnicas de inmunoterapia.

Para conocer si estos resultados coinciden con los fenómenos que tiene lugar durante el tratamiento quimioterapéutico de pacientes afectos de RMS embrionario, hemos realizado un estudio basado en la obtención de muestras titulares de estos tumores. Dichas muestras han sido seleccionadas en base a su tipo histológico y al contacto con las drogas de uso habitual en la terapia de estos tumores que, como sabemos, son administradas en forma de ciclos durante el curso de la enfermedad. Dada la baja frecuencia de tumores rhabdomyosarcomatosos y la selección realizada, el número de muestras para el estudio ha sido reducido.

Debemos tener en cuenta que, en este estudio, la determinación de los niveles de expresión de *mdr1* fue realizada mediante PCR, lo que nos permite detectar los niveles de ARNm después de que éste es transformado en ADNc mediante la técnica de la reverso-transcriptasa (RT). Esta modificación en el protocolo de experimentación se explica por la dificultad de obtener suficiente cantidad de ARNm y con la suficiente calidad a partir de cortes histológicos como para realizar Northern blot.

En una primera aproximación a este estudio hemos podido determinar que la proporción de RMS embrionarios que tras tratamiento quimioterapéutico desarrollan resistencia mediada por P-gp se sitúa en torno al 50%, siendo la expresión de *mdr 1* variable (en términos densitométricos corregidos mediante la señal de beta-actina, entre  $2.08 \pm 0.4$  en la muestra con mayor expresión y  $0.34 \pm 0.09$  en la muestra con menor expresión). Resultados similares fueron obtenidos por Komdeur et al. (2003) en un grupo también de catorce pacientes con RMS, aunque en este caso, es importante

señalar dos hechos, que el grupo de estudio incluyó RMS de tipo embrionario, alveolar y pleomórfico y que fue realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas que poseen una sensibilidad menor a la utilizada por nosotros. Estos datos vienen a confirmar que el tratamiento citotóxico clásico de los RMS es capaz de inducir la expresión de este gen y sugieren que este puede ser la base del fracaso de la quimioterapia de estos tumores. De hecho, estudios más amplios, como los realizados por Gallego y cols. (2004), quienes analizan 23 RMS (aunque incluyendo los subtipos embrionario y alveolar), demuestran una elevada expresión de *mdr 1*. No obstante, en este caso se observó la asociación a la expresión de la proteína MRP, lo que indica que no podemos descartar otros mecanismos en el desarrollo de un fenotipo resistente de las células de RMS.

En este sentido, parece que la aparición de mecanismos de resistencia no asociados a P-gp es más frecuente en los RMS detectados en adultos. Así, por ejemplo la expresión de LRP, una proteína de bóveda relacionada con la resistencia a drogas, ha sido detectada en RMS pleomórfico y embrionario en este tipo de pacientes. Esta misma proteína, sin embargo, no se expresa en RMS alveolares en estas mismas edades, lo que podría implicar que su aparición depende del subtipo histológico del tumor (Komdeur y cols., 2003).

Las implicaciones que derivan de nuestros resultados y que suponen la confirmación de desarrollo de resistencia mediada por P-gp en RMS embrionarios tratados mediante terapia citotóxica convencional, suponen, en primer lugar, un dato relevante desde el punto de vista del pronóstico. Dicha resistencia no sólo supone una dificultad para el éxito de la quimioterapia, sino que además, puede estar implicado en el grado de potencial metastático que posee el tumor. De hecho, se ha podido constatar en otros tipos tumorales, que el desarrollo de resistencia va asociado a una más frecuente detección de procesos metastásicos. Tal es el caso del cáncer de colon, de

mama, el melanoma y el neuroblastoma (Weinstein y cols., 1991; Henequin y cols., 1993; Levine y cols., 1993; Ferrandis y cols., 1994).

Pero además, el incremento en la expresión de antígenos HLA y la demostrada capacidad metastásica de diferentes tipos de tumores, sugiere una relación entre ambos, a pesar de que esta última correlación no ha sido del todo demostrada (Moulton y cols., 1992), cada vez existen más datos que apuntan hacia que la modulación de estos antígenos puede tener una gran importancia clínica, ya que su determinación parece indicar una mayor agresividad en el desarrollo de la patología (García-Lora y cols. 2003). En este contexto, el incremento de HLA de clase I observado en las líneas con fenotipo resistente analizadas (principalmente en A-204-1 y 2 que fueron tratadas con dosis terapéuticas de actinomicina D y el detectado en la línea RMS-GR obtenida tras tratamiento in vivo) podrían suponer de esta agresividad.

Una diferente expresión de moléculas MHC también fue observada en los estudios inmunohistoquímicos realizados a las muestras de tejido derivadas de RMS. En estos estudios, los anticuerpos utilizados fueron los mismos (W6/32 y GRH1) que los empleados en el análisis fluorocitométrico de las líneas tumorales resistentes. Previamente, Fernández y cols. (1991) ya habían observado diferencias de expresión de MHC en un grupo de estudio que incluía las tres variedades histológicas de RMS. En nuestro caso, hemos podido observar una expresión variable de estos antígenos en los RMS analizados. Así, el 50% fueron considerados positivos para HLA de clase I, si bien es cierto, que con diferentes grados de positividad. En conjunto, cuatro muestras fueron consideradas con intensidad de marcaje grado 3 (fuerte), una con marcaje grado 2 (moderado) y una con marcaje grado 1 (débil).

Pero quizás, más importante es el hecho de que el análisis de correlación permitió observar como las muestras que presentaban expresión



de mdr 1 eran predominantemente positivas para la expresión de antígenos HLA de clase I (71%) mientras que, por el contrario, las muestras en las que mdr 1 no pudo ser detectado, la expresión de antígenos HLA fue predominantemente negativa (83%). Nuestros estudios arrojaron resultados similares cuando se realizaron con el anticuerpo W6/32 y GRH1, lo que demuestra que los RMS sometidos in vivo a un tratamiento con quimioterapia no sólo desarrollan resistencia mediada por P-gp, sino que esta molécula es capaz de modular la expresión de los antígenos MHC, tal y como ocurría en los cultivos celulares. Será necesario analizar si las modificaciones encontradas en la expresión de antígenos HLA en este tipo de tumores se relacionan con el potencial metastásico ya que este hecho tendría importantes implicaciones clínicas.

Pero además, la modulación de antígenos HLA de clase I en patologías tumorales posee una segunda implicación clínica que en este caso se relaciona con el éxito de la aplicación de inmunoterapia para su tratamiento (Hirose y cols., 1999). Este hecho tiene su explicación en la demostrada necesidad de que las células tumorales expresen antígenos MHC como un prerrequisito para la actuación de las células T citolíticas. Estas últimas, inducen la destrucción de las células tumorales gracias al reconocimiento de antígenos presentados por las células neoplásicas (García-Lora y cols., 2003). En esta línea de investigación, experiencias de inmunoterapia basadas en la utilización de antígenos asociados a tumores del tipo de MAGE, BAGE y GAGE han tenido resultados positivos (Delerba y cols., 2001). En RMS, algunas experiencias ya han demostrado la posibilidad de aplicar protocolos de inmunoterapia, aunque los resultados han sido obtenidos sólo a nivel experimental mediante el trasplante de células derivadas de este tipo de tumor a ratones (Berezhnaya y cols., 2004). Recientemente, se ha determinado la expresión del antígeno MAGE-A en células de RMS. Estas, presentaban, sin embargo, una débil expresión del HLA. Tras la transfección de vectores retrovirales que conseguían la

expresión eficaz del antígeno, se ha podido observar el reconocimiento y la consiguiente destrucción de estas células, lo que indica la posibilidad de aplicar protocolos de inmunoterapia (Tanzarella y cols., 2004). Parece pues, que la determinación de HLA en diferentes tipos tumorales, entre los que se encuentran los RMS, puede suponer un dato decisivo en relación a la posible respuesta del paciente a este tipo de ensayos.

En este sentido, cada vez son más numerosos los estudios que, recuperando muestras de tejidos tumorales procesadas para su estudio inmunohistoquímico, analizan la expresión de moléculas HLA para determinar sus implicaciones biológicas y clínicas. Recientemente, un estudio realizado sobre cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), analizadas mediante el anticuerpo HC-10 específico para la cadena ligera de HLA de clase I (Ramnath y cols., 2005), ha permitido establecer tres grupos de pacientes dependiendo de su grado de expresión (negativos, heterogéneos y positivos). Dicho estudio determina una correlación entre la baja expresión de HLA y la supervivencia de los pacientes. Similares estudios serán necesarios en el caso de los RMS para determinar si la expresión de HLA puede representar un hecho importante desde el punto de vista de la evolución del paciente y de la posible aplicación de inmunoterapias específicas para estos tumores.

# CONCLUSIONES

1. Las dosis clínicas de actinomicina D usadas en el tratamiento combinado de pacientes afectos de rhabdomyosarcoma embrionario inducen en la línea A-204-1 y A-204-2 un fenotipo clásico de resistencia a drogas.

2. El desarrollo del fenotipo resistente observado en estas líneas implica que el efecto de las dosis clínicas de actinomicina D sobre las células tumorales de RMS, se reduce entre 34 y 100 veces.

3. La resistencia desarrollada por las células tumorales de RMS afecta no sólo a actinomicina D, sino también a las otras dos drogas utilizadas en el tratamiento combinado de los RMS como son vincristina y doxorubicina. Estos dos agentes reducen su efecto entre 22 y 37 veces y 63 y 88 veces respectivamente.

4. El mecanismo de resistencia desarrollado por las líneas de RMS A-204-1 y A-204-2 se basa en la sobreexpresión del gen *mdr 1* y la consiguiente síntesis de la molécula P-glicoproteína.

5. Los niveles de ARNm del gen *mdr1* detectados en las líneas resistentes de RMS sugieren que la expresión de P-glicoproteína es dosis dependiente.

6. El desarrollo del fenotipo resistente en células de RMS mediado por P-glicoproteína modula su patrón antigénico, produciéndose un incremento significativo en la expresión de antígenos HLA de clase I.

7. Los estudios mediante el agente bloqueante verapamilo, demuestran que el incremento en los niveles de HLA de clase I en las células de RMS resistentes es causa directa de la acción de P-glicoproteína y depende de sus niveles de expresión y por tanto de la dosis de citotóxico empleadas.

8. *El desarrollo de resistencia en las células tumorales de RMS se acompaña de signos de diferenciación celular que son fundamentalmente observados a nivel ultraestructural.*

9. *La utilización de la terapia combinada en pacientes afectos de RMS embrionario provoca resistencia mediada por P-glicoproteína que se asocia a modulaciones en la expresión de antígenos HLA de clase I.*

10. *La aparición de resistencia mediada por mdr1 en pacientes afectos de RMS embrionario y su asociación a cambios en la expresión de moléculas MHC, pueden tener gran relevancia desde el punto de vista clínico:*

*-en primer lugar, en cuanto a las posibles modificación en el potencial metastásico de este tipo de tumores que influye decisivamente en el pronóstico de los pacientes.*

*-en segundo lugar, en cuanto a la posibilidad de aplicar de forma individualizada protocolos de inmunoterapia.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelstein, R.S., Eisenberg, E. *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. Annu. Rev. Biochem.*, 49: 921-926. (1984).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. In: **Molecular Biology of the Cell**, 2nd ed. New York. Garland Publishing, Inc. 1322:7-15. (1989).
- Alema, S., Tato, F. *Interaction of retroviral oncogenes with the differentiation program of myogenic cells. Adv. Cancer Res.*, 49: 1-28. (1987).
- Almquist, K.C., Loe, D.W., Hipfner, D.R., Mackie, J.E., Cole, S.P.C., Deeley, R.G. *Characterization of the M, 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. Cancer Res.*, 55: 102-110. (1995).
- Al-Rawi, M.A., Rmali, K., Watkins, G., Mansel, R.E., Jiang, W.G. *Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. Eur. J. Cancer*, 40: 494-502. (2005).
- Aránega, A., González, F.J., Aránega, A.E., Muros, M.A., Fernández, J.E., Vélez, C., Prados, J., Alvarez, L. *Effects of fibric acid derivatives on accumulation of actin in myocardiocytes. Int. J. Cardiol.*, 33: 47-54. (1991).
- Arndt, C., Tefft, M., Gehan, E., Anderson, J., Jenson, M., Link, M., Donaldson, S., Breneman, J., Wiener, E., Webber, B., Maurer, H. *A feasibility, toxicity, and early response study of etoposide, ifosfamide, and vincristine for the treatment of children with rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) IV pilot study. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 19: 124-129. (1997).
- Arndt, C.A., Donaldson, S.S., Anderson, J.R., Andrassy, R.J., Laurie, F., Link, M.P., Raaney, R.B., Maurer, H.M., Crist, W.M. *What constitutes optimal therapy for patients with rhabdomyosarcoma of the female genital tract? Cancer*, 91: 2454-68. (2001).
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. *Death receptors: signalling and modulation. Science*, 281: 1305-1308. (1998).

- Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., Jacks, T. *PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family.* **Genes Dev.**, 14: 704-718. (2000).
- Avendano, C., Menendez, J.C. *Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR).* **Curr. Med. Chem.**, 9: 159-193. (2002).
- Awasthi, S., Sharma, R., Singhal, S.S., Herzog, N.K., Chaubey, M., Awasthi, Y.C. *Modulation of cisplatin cytotoxicity by sulphasalazine.* **Br. J. Cancer**, 70: 190-194. (1994).
- Baer, MR., George, SL., Dodge, RK. *Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukaemia.* **Cancer and Leukemia, Group B Study 9720.** *Blood*, 100: 1224-1232. (2002).
- Baker, K.S., Anderson, J.R., Link, M.P., Grier, H.E., Qualman, S.J., Maurer, H.M., Breneman, J.C., Wiener, E.S., Crist, W.M. *Benefit of intensified therapy for patients with local or regional embryonal rhabdomyosarcoma: results from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV.* **J. Clin. Oncol.**, 18: 2427-2434. (2000).
- Baker, EK., Johstone, RW., Zalcborg, JR., El-Osta, A. *Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs.* **Oncogene**, 2005, 8 (In press).
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Glafre, G., Milsten, C., Willians, A.S., Ziegler, A. *Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human surface antigens. New tools for genetic analysis.* **Cell**, 14: 2-9. (1978).
- Bates, S.E., Mickley, L.A., Chen, Y.N. *Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines: Modulation by retinoic acid-induced differentiation.* **Mol. Cell. Biol.**, 9: 4337-4344. (1989).
- Bates, S.E. *Solving the problems of multidrug resistance: ABC transporters in clinical oncology.* In: **ABC Proteins: From Bacteria to Man.** Holland IB, Cole SP, Kuchler K y cols., eds. London: Elsevier Science, 359-391. (2002).



- Beck, W.T., Cirtain, M.C. *Continued expression of vinca alkaloid resistance by CCRF-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase.* **Cancer Res.**, 42: 184-189. (1982).
- Beck, W.T., Mueller, T.J., Tanzer, L.R. *Altered surface membrane glycoconjugates in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphomas.* **Cancer Res.**, 39: 2070-2076. (1979).
- Beketic-Oreskovic, L., Duran, G.E., Chen, G., Dumontet, C., Sikic, B.I. *Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833.* **J. Natl. Cancer Inst.**, 87: 1593-1602. (1995).
- Benard, J., Da Silva, J., Teyssier, J.R., Riou, G. *Over-expression of *mdr 1* gene with no DNA amplification in a multiple-resistant human ovarian carcinoma cell line.* **Int. J. Cancer**, 43: 471-477. (1989).
- Berezhnaya, N.M., Kovalchuck, E.V., Vinnichuck, Y.D., Spivak, SI., Belova, O.B. *Experimental immunotherapy of mice with transplanted MC-rhabdomyosarcoma resistant to doxorubicin.* **Eksp. Onkol.**, 26: 63-66. (2004).
- Bhalla, K., Hindenburg, A., Taub, R.N., Grant, S. *Isolation and characterization of an anthracycline-resistant human leukemic cell line.* **Cancer Res.**, 45: 3657-3662. (1985).
- Biedler, J.L., Chang, T.D., Meyers, M.B., Peterson, R.H.F., Spengler, B.A. *Drug resistance in Chinese hamster lung and mouse tumor cells.* **Cancer Treat. Reports**, 67: 859-867. (1983).
- Blakely, M.L., Andrassy, R.J., Raney, R.B., Anderson, J.R., Wiener, E.S., Rodeberg, D.A., Paidas, C.N., Lobe, T.E., Crist, W.M. *Prognostic factors and surgical treatment guidelines for children with rhabdomyosarcoma of the perineum or anus: a report of Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I through IV, 1972 through 1997.* **J. Pediatr. Surg.**, 38: 347-53. (2003).
- Blankenstein, T., Rowley, D.A., Schreiber, H. *Cytokines and cancer: experimental systems.* **Curr. Opin. Immunol.**, 3: 694-698. (1991).

- Bohacova, V., Kvackajova, J., Barancik, M., Drobna, Z., Breier, A. *Glutathione S-Transferase Does Not Play a Role in Multidrug Resistance of L1210/VCR Cell Line. **Physiol. Res.**, 49: 447-453. (2000).*
- Boiocchi, M., Toffoli, G. Mechanism of multidrug resistance in human tumour cell lines and complete reversion of cellular resistance. **Eur. J. Cancer**, 28:1099-1105. (1992).
- Bordow, S.B., Haber, M., Madafiglio, J., Cheung, B., Marshall, G.M., Norris, M.D. *Expression of the multidrug resistance-associated protein MRP gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. **Cancer Res.**, 54: 5036-5040. (1994).*
- Bramwell, V.H., Morris, D., Ernst, D.S. *Safety and efficacy of the multidrug-resistance inhibitor biricodar (VX-710) with concurrent doxorubicin in patients with anthracycline-resistant advanced soft tissue sarcoma. **Clin. Cancer Res.**, 8: 383-393. (2002).*
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., Arnold, H.H. *A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion of 10T1/2 fibroblast. **EMBO J.**, 8: 701-709. (1989).*
- Bredel, M. *Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, 35: 161-204. (2001).*
- Breitfeld, P.P., Lyden, E., Raney, R.B., Teot, L.A., Wharam, M., Lobe, T., Crist, W., Maurer, H.M., Donaldson, S.S., Ruymann, F.B. *Ifosfamide and etoposide are superior to vincristine and melphalan for pediatric metastatic rhabdomyosarcoma when administered with irradiation and combination chemotherapy: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 23: 225-33. (2001).*
- Breneman, J., Anderson, J., Donaldson, S. *Prognostic factors and outcome in children with metastatic rhabdomyosarcoma - a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 51: (3 suppl 1): A-210, 118. (2001).*

- Breneman, J.C., Lyden, E., Pappo, A.S., Link, M.P., Anderson, J.R., Parham, D.M., Qualman, S.J., Wharam, M.D., Donaldson, S.S., Maurer, H.M., Meyer, W.H., Baker, K.S., Paidas, C.N., Crist, W.M. *Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma -a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV.* **J. Clin. Oncol.**, 21: 78-84. (2003).
- Brown, S., Levinson, W., Spudich, J.A. *Cytoskeletal elements of chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction.* **J. Supramol. Struct.**, 5: 119-130. (1976).
- Brown, D.C., Theaker, J.M., Banks, P.M., Gatter, K.C., Mason, D.Y. *Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumours.* **Histopathol.**, 11: 477-486. (1987).
- Broxterman, H.J., Sonneveld, P., van Putten, W.J., Lankelma, J., Eekman, C.A., Ossenkoppelo, G.J., Pinedo, H.M., Lowenberg, B., Schuurhuis, G.J. *P-glycoprotein in primary acute myeloid leukemia and treatment outcome of idarubicin/cytosine arabinoside-based induction therapy.* **Leukemia**, 14: 1018-24. (2000).
- Burns, T.F., Bernhard, E.J., El-Deiry, W.S. *Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo.* **Oncogene**, 20: 4601-4612. (2001).
- Buzzedo, R., Enkermann, S., Nimmanapalli, R., Alsina, M. *Characterization of a R115777-resistant human multiple myeloma cell line with cross-resistance to PS-341.* **Clin. Cancer Res.**, 11:6057-6064. (2005).
- Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., López, M., De La Higuera, B., Sánchez, M., Garrido, F. *Characterization of monoclonal antibodies against HLA class II molecules.* **Hybridoma**, 5: 191-198. (1986).
- Caffrey, J.M., Brown, A.M., Schneider, M.D. *Mitogens and oncogenes can block the induction of specific voltage-gated ion channels.* **Science**, 236: 570-573. (1987).

- Cao, L., Duchrow, M., Windhövel, U., Kujath, P., Bruch, H.P., Broll, R. *Expression of MDR1 mRNA and encoding P-glycoprotein in archival formalin-fixed paraffin-embedded gall bladder cancer tissues.* **Eur. J. Cancer**, 34: 1612-1617. (1998).
- Carli, M., Colombatti, R., Oberlin, O., Stevens, M., Masiero, L., Frascella, E., Koscielniak, E., Treuner, J., Pinkerton, C.R. *High-dose melphalan with autologous stem-cell rescue in metastatic rhabdomyosarcoma.* **J. Clin. Oncol.**, 17: 2796-2803. (1999).
- Casanova, M., Ferrari, A., Spreafico, F., Terenziani, M., Máximo, M., Luksch, R., Cefalo, G., Polastri, D., Marcon, I., Bellani, F. *Vinorelbine in previously treated advanced childhood sarcomas: evidence of activity in rhabdomyosarcoma.* **Cancer**, 94: 3263-3268. (2002).
- Cecchetto, G., Bisogno, G., Treuner, J., Ferrari, A., Mattke, A., Casanova, M., Dall'Igna, P., Zanetti, I., Volpato, S., Siracusa, F., Scarzzello, G., Boglino, C., Carli, M. *Role of surgery for nonmetastatic abdominal rhabdomyosarcomas: a report from the Italian and German Soft Tissue Cooperative Groups Studies.* **Cancer**, 97: 1974-1980. (2003).
- Chan, H.S., Thorner, P.S., Haddad, G., Ling, V. *Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood.* **J. Clin. Oncol.**, 8: 689-704. (1990).
- Chan, H.S.L., Grogan, T.M., Deboer, G., Haddad, G., Gallie, B.L., Ling, V. *Diagnosis and reversal of multidrug resistance in paediatric cancer.* **Eur. J. Cancer**, 32: 1051-1061. (1996).
- Chan, H.S.L., Haddad, G., Hipfner, D.R., Decley, R.G., Cole, S.P.C. *Sensitive detection of the multidrug resistance protein (MRP) in malignant cells.* **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, 36: 326. (1995).
- Chen, G., Waxman, D.J. *Role of cellular glutathione and glutathione S-transferase in the expression of alkylating agent cytotoxicity in human breast cancer cells.* **Biochem. Pharmacol.**, 47: 1079-1087. (1994).
- Chiou, W.L., Chung, S.M., Wu, T.C. *Apparent lack of effect of P-glycoprotein on the gastrointestinal absorption of a substrate, tacrolimus, in normal mice.* **Pharm. Res.**, 17: 205-208. (2000).

- Choi, K., Chen, C., Kriegler, M., Roninson, I.B. *An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene.* **Cell**, 53: 519-529. (1988).
- Choi, J., Costa, M.L., Mermelstein, C.S., Chagas, C., Holtzer, S., Holtzer, H. *MyOD1 converts primary dermal fibroblast, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 7988-7992. (1990).
- Churg, A. *Immunohistochemical staining for vimentin and keratin in malignant mesothelioma.* **Am. J. Surg. Pathol.**, 9: 360-365. (1986).
- Clifford, S.C., Neal, D.E., Lunec, J. *High level expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in the normal bladder urothelium: a potential involvement in protection against carcinogens?.* **Carcinogenesis**, 17: 601-604. (1996).
- Cocker, H.A., Tiffin, N., Pritchard-Jones, K., Pinkerton, CR., Kelland, L.R. *In vitro prevention of the emergence of multidrug resistance in a pediatric rhabdomyosarcoma cell line.* **Clin. Cancer Res.**, 7: 3193-3198. (2001).
- Coindre, J. M., de Mascarel, A., Trojani, M., de Mascarel, I., Pages, A. *Immunohistochemical study of rhabdomyosarcoma. Unexpected staining with S100 protein and cytokeratin.* **J. Pathol.**, 155: 127-132. (1988).
- Cole, S.P. The 1991 Mecrck Frosst Award. *Multidrug resistance in small cell lung cancer.* **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 70: 313-329. (1992).
- Cole, S.P.C., Sparks, K.E., Fraser, K., Loe, D.W., Grant, C.E., Wilson, G.M. *Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells.* **Cancer Res.**, 54: 5902-5910. (1994).
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Cassals, D., Bertino, J.R., Melamed, M.R. *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissue.* **J. Histochem. Cytochem.**, 38: 1277-1287. (1990).

- Cosetti, M., Wexlerm L.H., Calleja, E., Trippett, T., LaQuaglia, M., Huvos, A.G., Gerald, W., Healey, J.H., Meyers, P.A., Gorlick, R. *Irinotecan for pediatric solid tumors: the Memorial Sloan-Kettering experience.* **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 24: 101-105. (2002).
- Cree, I.A., Knight, L., Di Nicolantonio, F., Sharma, S., Gulliford, T. *Chemosensitization of solid tumors by modulation of resistance mechanisms.* **Curr. Opin. Investig. Drugs.**, 3: 634-640. (2002).
- Crist, W., Gehan, E.A., Ragab, A.H., Dickman, P.S., Donaldson, S.S., Fryer, C., Hammond, D., Hays, D.M., Hermann, J., Heyn, R. *The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study.* **J. Clin. Oncol.**, 13: 610-630. (1995).
- Crist, W.M., Anderson, J.R., Meza, J.L., Fryer, C., Raney, R.B., Ruymann, F.B., Breneman, J., Qualman, S.J., Wiener, E., Wharam, M., Lobe, T., Webber, B., Maurer, H.M., Donaldson, S.S. *Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease.* **J. Clin. Oncol.**, 19: 3091-3102. (2001).
- Cromme, F.V., Airey, J., Heemels, M.T., Ploegh, H.L., and Walboomers JMM: *Loss of transporter protein, encoded by the TAP-2 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas.* **J. Exp. Med.**, 179: 335. (1994).
- Daar, A.D., Fuggle, S.V., Fabre, J., Ting, A., Morris, J. *The detailed distribution of HLA ABC antigens in normal human organs.* **Transplantation**, 38: 287-297. (1984).
- Danks, M.K., Qui, J., Capatano, C.V., Schmidt, C.A., Beck, W.T., Fernandez, D.J. *Subcellular distribution of the alpha and beta topoisomerase II-DNA complexes stabilized by VM-26.* **Biochem. Pharmacol.**, 48: 1785-1795. (1994).
- Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B. *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.* **Cell**, 51: 987-1000. (1987).

- De Zen, L., Sommaggio, A., d'Amore, E.S., Massiero, L., di Montezemolo, L.C., Linari, A., Mandon, E., Dominici, C., Bosco, S., Bisogno, G., Carli, M., Ninfo, V., Basso, G. *Clinical relevance of DNA ploidy and proliferative activity in childhood rhabdomyosarcoma: a retrospective analysis of patients enrolled onto the Italian Cooperative Rhabdomyosarcoma Study RMS88.* **J. Clin. Oncol.**, 15: 1198-1205. (1997).
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.* **J. Lipid Res.**, 42: 1007-1017. (2001).
- Debatin, K.M. *Apoptosis pathway in cancer and cancer therapy.* **Cancer Immunol. Immunother.**, 53: 153-159. (2004).
- Delerba, P., Frascella, E., Mascino, B., Mandruzzato, S., Zambon, A., Rosolen, A., Carli, M., Ninfo, V., Zanovello, P. *MAGE, BAGE and GAGE gene expression in human rhabdomyosarcomas.* **Int. J. Cancer**, 93: 85-90. (2001).
- Devine, S.E., Ling, V., Melera, P.W. *Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of the P-glycoprotein alter multidrug resistance.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 4564-4568. (1992).
- Dey, S., Hafkemeyer, P., Pastan, I., Gottesman, M.M. *A single amino acid residue contributes to distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter by stereoisomers of the dopamine receptor antagonist flupentixol.* **Biochemistry**, 38:6630-6639. (1999).
- Diller, L., Sexsmith, E., Gottlieb, A., Li, F.P., Malkin, D. *Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma.* **J. Clin. Invest.**, 95: 1606-1611. (1995).
- Donaldson, S.S., Asmar, L., Breneman, J., Fryer, C., Glicksman, A.S., Laurie, F., Wharam, M., Gehan, E.A. *Hyperfractionated radiation in children with rhabdomyosarcoma -results of an Intergroup Rhabdomyosarcoma Pilot Study.* **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 32: 903-911. (1995).
- Doppenschmitt, S., Langguth, P., Regardh, C.G., Andersson, T.B., Hilgendorf C, Spahn-Langguth H. *Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: development of a [3H] verapamil radioligand-binding assay.* **Pharmacol. Exp. Ther.**, 288: 348-57. (1999).

- Durie, B.G., Dalton, W.S. *Reversal of drug-resistance in multiple myeloma with verapamil.* **Br. J. Haematol.**, 68: 203-206. (1988).
- Ebashi, S., Ebashi, F., Maruyama, K. *A new protein factor promoting contraction of actomyosin.* **Nature**, 203: 645-646.(1964).
- Edmondson, D.G., Olson, E.N. *A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program.* **Gen. Dev.**, 3: 628-640. (1989).
- Eisenberg, E., Kielley, W.W. *Troponin-Tropomyosin complex. Column chromatographic separation and activity of the three active troponin components with and without tropomyosin present.* **J. Biol. Chem.**, 249: 4742-4748. (1974).
- Ejendal, K.F., Hrycyna, CA. *Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2.* **Curr. Protein Pept. Sci.**, 3: 503-511. (2002).
- Elzinga, M., Phelan, J.J. *F-actin is intermolecularly crosslinked by N,N'-p-phenylenedimaleimide through lysine-191 and cysteine-374.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 6599-6602. (1984).
- Enkemann, S.A., Konieczny, S.F., Taparowsky, E.J. *Adenovirus 5 E1A represses muscle-specific enhancers and inhibits expression of the myogenic regulatory factor genes, MyoD1 and myogenin.* **Cell Growth Dif.**, 1: 375-382. (1990).
- Eralp, Y., Bavbek, S., Basaran, M., Kaytan, E., Yaman, F., Bilgic, B., Darendeliler, E., Onat, H. *Prognostic factors and survival in late adolescent and adult patients with small round cell tumors.* **Am. J. Clin. Oncol.**, 25: 418-424. (2002).
- Evan, G.I., Vousden, K.H. *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.* **Nature**, 411: 342-348. (2001).
- Falcone, G., Summerhayes, I.C., Paterson, H., Marshall, C.J., Hall, A. *Partial transformation of mouse fibroblastic and epithelial cell lines with the v-myc oncogene* **Exp. Cell Res.**, 168: 273-284. (1987).



- Fernández, J.E., Concha, A., Aránega, A., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Garrido, F. *HLA class I and II expression in rhabdomyosarcomas. Immunobiol.*, 182: 440-448. (1991).
- Fernández, J.E., Prados, J., Melguizo, C., Arena, N., Malavasi, F., Álvarez, L., Aránega, A. *Characterization of a new human embryonal rhabdomyosarcoma cell line, RMS-GR. Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 525-532. (1998).
- Ferrandis, E., Da Silva, J., Riou, G., Benard, I. *Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. Cancer Res.*, 54: 2256-2261.(1994).
- Ferrari, A., Casanova, M. *Current chemotherapeutic strategies for rhabdomyosarcoma. Expert Rev. Anticancer Ther.*, 5: 283-294. (2005).
- Ferruzzi, F., Franceschini, R., Cazzolato, G., Geroni, C., Fowst, C., Pastorino, U., Tradati, N., Tursi, J., Dittadi, R., Gion, M. *Blood glutathione as a surrogate marker of cancer tissue glutathione S-transferase activity in non-small cell lung cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur. J. Cancer.*, 39:1019-1029. (2003).
- Forbes, M.J., Sperelaki, N. *Ultrastructure of mammalian cardiac muscle. In: Physiology and Pathophysiology of the Heart.*, Sperelakis, N. (ed). Boston. pp. 3-24. (1984).
- Fracasso, P.M., Brady, M.F., Moore, D.H., Walker, J.L., Rose, P.G., Letuak, L., Grogan, T.M., Mc Guire, W.P. *Phase II study of paclitaxel and valspodar (PSC 833) in refractory ovarian carcinoma: a gynecologic oncology group study. J. Clin. Oncol.*, 19: 2975-2982. (2001).
- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K. *Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5034-5038. (1978).
- Fromm, M.F. *The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 1295-1310. (2002).
- Fuchs, E., Tyner, A.G., Guidice, G.J., Marchuk, D., RayChaudhury, A., Rosemberg, M. *The human keratin genes and their differential expression. Curr. Topics. Dev. Biol.*, 22: 5-34. (1987).

- Gabbert, H.E., Gerharz, C.D., Biesalski, H.R., Engers, R., Luley, C. *Terminal differentiation and growth inhibition of a rat rhabdomyosarcoma cell line (BA-HAN-1C) in vitro after exposure to retinoic acid.* **Cancer Res.**, 48: 5264-5269. (1988).
- Gallego, S., Llorca, A., Parareda, A., Sanchez de Toledo, J. *Expression of multidrug resistance-1 and multidrug resistance-associated protein genes in pediatric rhabdomyosarcoma.* **Oncol. Rep.**, 11: 179-183. (2004).
- Gangopadhyay, S., Lalali, F., Reda, D., Peacock, J., Bristol, R.G., Benchimol, S. *Expresión of different mutant p53 transgenes in neuroblastoma cells leads to different cellular responses to genotoxic agents.* **Exp. Cell Res.**, 275: 122-131. (2002).
- García-Lora, A., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F. *Tumour immunology, vaccination and escape strategies.* **Eur. J. Immunogenet.**, 30:177-183. (2003).
- García-Lora, A., Algarra, I., Garrido, F. *MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape.* **J. Cell. Physiol.**, 195: 346-355. (2003).
- Garvin, A.J., Stanley, W.S., Bennett, D., Sullivan J.L., Sens, D.A. *The in vitro growth, heterotransplantation, and differentiation of a human rhabdomyosarcoma cell line.* **Am. J. Phathol.**, 125: 208-217. (1986).
- Geiger, B. *Intermediate filaments: looking for a function.* **Nature**, 329: 392-393. (1983).
- Georgatos, S., Blobel, G. *Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes.* **J. Cell. Biol.**, 105: 105-115. (1987).
- German, U.A. *P-glycoprotein-a mediator of multidrug resistance in tumour cells.* **Eur. J. Cancer**, 32: 927-944. (1996).
- Gervasoni, J.E., Fieds, S.Z., Krishna, S., Baker, M.A., Rosado, M., Thuraiamg, K., Hindenburg, A.A., Taub, R.N. *Subcellular distribution of daunomicin in P-glycoprotein-positive and negative drug-resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy.* **Cancer. Res.**, 51: 4955-4963. (1991).

- Gomi, A., Shinoda, S., Masuzawa, T., Ishikawa, T., Kuo, M.T. *Transient induction of the MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea in human glioma cells.* **Cancer Res.**, 57: 5292-5299. (1997).
- Gordon, T., Mcmanus, A., Anderson, J., Min, T., Swansbury, J., Pritchard-Jones, K., Shipley, J. *Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study.* **Med. Pediatr. Oncol.**, 36: 259-267, (2001).
- Gown, A.M., Heather, C.B., Chang, Y., Ferguson, M., Reichler, B., Tippens, D. *Smooth muscle cells can express cytokeratins of simple epithelium. Immunocytochemical and biochemical studies in vitro and in vivo.* **Am. J. Pathol.**, 132: 223-232. (1988).
- Grandi, M., Geroni, C., Giulani, F.C. *Isolation and characterization of a human colon adenocarcinoma cell line resistant to doxorubicin.* **Br. J. Cancer**, 54: 515-518. (1986).
- Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P.C., Deeley, R.G. *Overexpression of multidrug resistance associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs.* **Cancer Res.**, 54: 357-361. (1994).
- Gros, P., Croop, J., Housman, D.E. *Mammalian multidrug resistance gene complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins.* **Cell**, 47: 371-380. (1986).
- Grossman, Z., Herberman, R.B. *Immune surveillance without immunogenicity.* **Immunol. Today**, 7: 128-131. (1986).
- Gruber, A., Larsson, R., Nygren, P., Bjorkholm, M., Peterson, C. *A non-P-glycoprotein-mediated mechanism of vincristine transport which is affected by resistance modifiers and present in chemosensitive cells.* **Leukemia**, 8: 985-989. (1994).
- Gupta, V., Jani, J.P., Jacobs, S., Levitt, M., Fields, L., Awasthi, S., Xu, B.H., Sreevardhan, M., Awasthi, Y.C., Singh, S.V. *Activity of melphalan in combination with the glutathione transferase inhibitor sulfasalazine.* **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 36: 13-19. (1995).

- Gurney, J.G., Young, J.L. Jr, Roffers, S.D. Soft tissue sarcomas. In: **Cancer incidence and survival among children and adolescents**. United States SEER Program 1975-1995. Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al., eds.: Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, 1999. 111-123. (2005).
- Han, K., Kahng, J., Kim, M., Lim, J., Kim, Y., Cho, B., Kim, H.K., Min, W.S., Kim, C.C., Lee, K.Y., Kim, B.K., Kang, C.S. *Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia*. **Acta Haematol.**, 104: 174-180. (2000).
- Han, Y., Chen, X.P., Huang, ZY., Zhu, H. *Nude mice multi-drug resistance model of orthotopic transplantation of liver neoplasm and Tc-99m MIBI SPECT on p-glycoprotein*. **World J. Gastroenterol.**, 11: 3335-3358. (2005).
- Harris, PE., Lupu, F., Hong, B., Reed, EF., Suci-Foca, N. *Differentiation stage-specific self-peptide bound by major histocompatibility complex class I molecules*. **J. Exp. Med.**, 177: 783-790. (1993).
- Hasegawa, S., Abe, T., Naito, S., Kotoh, S., Kumazawa, J., Hipfner, D.R., Deeley, R.G., Cole, S.P., Kuwano, M. *Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP), MDR1, and DNA Topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cancer cell lines*. **Br. J. Cancer**, 71: 907-913. (1995).
- Hawkins, D.S., Anderson, J.R., Paidas, C.N., Wharam, M.D., Qualman, S.J., Pappo, A.S., Scott Baker, K., Crist, W.M. *Improved outcome for patients with middle ear rhabdomyosarcoma: a children's oncology group study*. **J. Clin. Oncol.**, 19: 3073-3079. (2001).
- Hays, D.M., Lawrence, W. Jr. Wharam, M., Newton, W. Jr., Ruymann, F.B., Beltangady, M., Maurer, H.M. *Primary reexcision for patients with 'microscopic residual' tumor following initial excision of sarcomas of trunk and extremity sites*. **J. Pediatr. Surg.**, 24: 5-10. (1989).
- Hayward, L.J., Zhu, Y.Y., Schwartz, R.J. *Cellular localization of muscle and non-muscle actin mRNAs in chicken primary myogenic cultures the induction of alpha-skeletal actin mRNA regulated independently of cardiac alpha-actin gene expression*. **J. Cell Biol.**, 106: 2077-2086. (1983).

- Hennequin, E., Delvincourt, C., Pourny, C., Jardillier, J.C. *Expression of mdr 1 gene in human breast primary tumors and metastases. Breast Cancer Res. Treat.*, 26: 267-274. (1993).
- Herr, I., Debatin, K.M. *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. Blood*, 98: 2603-2614. (2001).
- Heyn, R., Newton, W.A., Raney, R.B., Hamoudi, A., Bagwell, C., Vietti, T., Wharam, M., Gehan, E., Maurer, H.M. *Preservation of the bladder in patients with rhabdomyosarcoma. J. Clin. Oncol.*, 15: 69-75. (1997).
- Heyn, R., Ragab, A., Raney, R.B. Jr, Ruymann, F., Tefft, M., Lawrence, W. Jr., Soule, E., Maurer, H.M. *Late effects of therapy in orbital rhabdomyosarcoma in children. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. Cancer*, 57: 1738-1743. (1986).
- Hirano, M., Endoh, H., Okada, N., Numata, O., Watanabe, Y. *Tetrahytnema actin cloning and sequencing of the tetrahytnema actin gene identification of its gene product. J. Mol. Biol.*, 194: 145-153. (1987).
- Hirose, M., Hamano, S., Tobinaik, K., Kuroa, Y. *Cytosidal activity of PBL, LAK and IDEC-C2B8 and expression of HLA class 1, ICAM-1, and CD20 in vincristine-resistant hematologic cell lines. J. Hemother.*, 22: 237-244. (1999).
- Hofsli, E. *Multiple drug resistance--theoretical and clinical aspects. Tidsskr Nor Laegeforen*, 112: 472-474. (1992).
- Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A., Hale, P.T. *Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: Effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. J. Mol. Cardiol.*, 10: 1053-1058. (1978).
- Houghton, P.J., Cheshire, P.J., Myers, L., Stewart, C.F., Synold, T.W., Houghton, J.A. *Evaluation of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against xenografts derived from adult and childhood solid tumors. Cancer Chemother. Pharmacol.*, 31: 229-239. (1992).
- Hrycyna, C.A. *Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance. Semin. Cell Dev. Biol.*, 12: 247-56. (2001).

- Hua, J., Mutch, D.G., Herzog, T.J. *Stable suppression of MDR-1 gene using siRNA expression vector to reverse drug resistance in a human uterine sarcoma cell line.* **Gynecol. Oncol.**, 98: 31-38. (2005).
- Hussain, S.F., Heimberger, A.B. *Immunotherapy for human glioma: innovative approaches and recent results.* **Expert Rev. Anticancer Ther.**, 5:777-5790. (2005).
- Huxley, H.E. *The mechanism of muscular contraction.* **Science**, 164: 1356-1366. (1969).
- Ikenuchi, M., Matsumoto, M., Matsumoto, S. *Expression levels of cytokines in peritoneal washings from patients with gastric cancer.* **Tumour Biol.**, 25: 117-121. (2004).
- Isoldi, M.C., Visconti, MA., de Lauro, Castrucci, AM. *Anti-cancer drugs: molecular mechanisms of action.* **Mini Rev Chem.**, 5:685-695. (2005).
- Israel, M.A. *Molecular approaches to cancer therapy.* **Adv. Cancer Res.**, 60: 57-181. (1993).
- Iyer, L., Ramirez, J., Shepard, D.R., Bingham, C.M., Hosselld, D.K., Ratain, M.J., Mayer, L.L. *Biliary transport of irinotecan and metabolites in normal and P-glycoprotein- deficient mice.* **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 49: 336-341. (2002).
- Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Giaccone, G., Broxterman, H.J., Meijer, C.J.L. *Expression of the non-P-glycoprotein multidrug-resistance associated protein LRP in normal human tissues and tumours.* **Am. J. Pathol.**, 148: 877-887. (1996).
- Janeway, C.A. Jr., Travers, P. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc. Londres (1994).
- Jaynes, J.B., Johnson, J.E., Buskin, J.N., Gartside, C.L., Hauschka, S.D. *The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements including a muscle specific enhancer.* **Mol. Cell. Biol.**, 8: 62-70. (1988).
- Jin, S., Levine, A.J. *The p53 functional circuit.* **J. Cell Sci.**, 114: 4139-4120. (2001).

- Joly, F., Mangioni, C., Nicoletto, M. *A phase 3 study of PSC 833 in combination with paclitaxel and carboplatin (PC-PSC) versus paclitaxel and carboplatin (PC) alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary cancer of the peritoneum.* **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 21: 202a. (2002).
- Juliano, R.A., Ling, V. *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.* **Biochem. Acta**, 455: 152-162. (1976).
- Kato, M.A., Flamant, F., Terrier-Lacombe, M.J., Habrand, J.L., Schwaab, C., Luboinski, B., Valteau-Couanet, D., Lemerle, J. *Rhabdomyosarcoma of the larynx in children: a series of five patients treated in the Institut Gustave Roussy (Villejuif, France).* **Med. Pediatr. Oncol.**, 19: 110-114. (1991).
- Kawakami, Y., Fujita, Matsuzaki, Sakurai, Tsukamoto, M., Todam, M., Sumimoto, H. *Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer.* **Cancer Sci.**, 95: 784-91. (2004).
- Kedar, E., Klein, E. *Cancer immunotherapy: Are the results discouraging? Can they be improved?.* **Adv. Cancer Res.**, 59: 245-323. (1992).
- Kelly, K.M., Womer, R.B., Sorensen, P.H., Xiong, Q.B., Barr, F.G. *Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma.* **J. Clin. Oncol.**, 15: 1831-1836. (1997).
- Keppler, D. *Export pumps for glutathione S-conjugates.* **Free Radic. Biol. Med.**, 27: 985-991. (1999).
- Keshelava, N., Zuo, J.J., Chen, S.N., Waidyaratne, M.C., Luna, C.J., Gomer, T.J., Triche, C.P., Reynolds, C.P. *Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines.* **Cancer Res.**, 61: 6185-6193. (2001).
- Kimbrough, D.W., Potter, J.D. *Contractile proteins and phosphorylation.* In: **The Heart and Cardiovascular System. II**, Fozzard, H.A. (ed.). New York. Raven Press. pp. 779-788. (1986).

- Klingebl, T., Pertl, U., Hess, CF., Jürgens, H., Kolcieszniak, E., Potter, R., van Heek-Romanowski, R., Rossi, R., Schott, C., Spaar, HJ., Willnow, U., Treuner, J. *Treatment of children with relapsed soft tissue sarcoma: report of the German CESS/CWS REZ 91 trial.* **Med. Pediatr. Oncol.**, 30: 269-275. (1998).
- Komdeur, R., Klunder, J., van der Graaf, WT., van der Berg, de Bont, ES., Hoekstra, HJ., Molenaar, WM. *Multidrug resistance proteins in rhabdomyosarcomas: comparison between children and adults.* **Cancer**, 97: 1999-2005. (2003).
- Konieczny, S.F., Drobos, B.L., Menke, S.L., Taparowsky, E.J. *Inhibition of myogenic differentiation by the H-ras oncogene is associated with the down regulation of the MyoD1 gene.* **Oncogene**, 4: 473-481. (1989).
- Korn, E.D. *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells.* **Physiol. Rev.**, 62: 672-737. (1982).
- Koscielniak, E., Klingebl, T.H., Peters, C., Hermann, J., Burdach, S.T., Bender-Gotze, C., Muller-Weihrich, S.T., Treuner, J. *Do patients with metastatic and recurrent rhabdomyosarcoma benefit from high-dose therapy with hematopoietic rescue? Report of the German/Austrian Pediatric Bone Marrow Transplantation Group.* **Bone Marrow Transplant**, 19: 227-231. (1997).
- Krishna, R., Mayer, LD. *Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanism, reversal using modulators and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer.* **Eur. J. Pharm. Sci.**, 11: 265-283. (2000).
- Krishnamachary, N., Center, M.S. *The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein.* **Cancer Res.**, 53: 3658-3661. (1993).
- Kung, F.H., Desai, S.J., Dickerman, J.D., Goorin, A.M., Harris, M.B., Inove, S., Krischer, J.P., Murphy, S.B., Pratt, C.B., Toledan, S. *Ifosfamide/carboplatin/etoposide (ICE) for recurrent malignant solid tumors of childhood: a Pediatric Oncology Group Phase I/II study.* **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 17: 265-269. (1995).



- Kuttesch, J.F., Parham, D.M., Luo, X., Meyer, W.H., Bowman, L., Shapiro, D.N., Pappo, A.S., Crist, W.M., Beck, W.T., Houghton, P.J. P-glycoprotein expression at diagnosis may not be a primary mechanism of therapeutic failure in childhood rhabdomyosarcoma. **J. Clin. Oncol.**, 14: 886-900. (1996).
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D.R., Newmeyer, D.D. *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane.* **Cell**, 111: 331-342. (2002).
- Kuwano, M., Tosh, S., Uchiumi, T., Takano, H., Kohno, K., Wada, M. *Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance.* **Anticancer Drug Des.**, 14: 123-131. (1999).
- Langer, C.A. *Calcium at the sarcolemma.* **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 16: 147-152. (1984).
- LaQuaglia, M.P. *The surgical management of metastases in pediatric cancer.* **Semin. Pediatr. Surg.**, 2: 75-82. (1993).
- LaQuaglia, M.P., Heller, G., Ghavimi, F. *The effect of age at diagnosis on outcome in rhabdomyosarcoma.* **Cancer**, 73: 109-117. (1994).
- Lassar, A.B., Thayer, M.J., Overell, R.W., Weintraub, H. *Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1.* **Cell**, 58: 659-667. (1989).
- Lawrence, W. Jr., Anderson, J.R., Gehan, E.A., Maurer, H. *Pretreatment TNM staging of childhood rhabdomyosarcoma: a report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. Children's Cancer Study Group. Pediatric Oncology Group.* **Cancer**, 80: 1165-1170. (1997).
- Lawrence, W. Jr., Gehan, E.A., Hays, D.M., Beltangady, M., Maurer, H.M. *Prognostic significance of staging factors of the UICC staging system in childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-II).* **J. Clin. Oncol.**, 5: 46-54. (1987).
- Lawrence, W. Jr., Neifeld, J.P. *Soft tissue sarcomas.* **Curr. Probl. Surg.**, 26: 753-827. (1989).

- Lazarides, E. *Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.* **Nature**, 283: 249-256. (1980).
- Lazarides, E. *The distribution of desmin (100 A) filaments in primary cultures of embryonic chick cardiac cells.* **Exp. Cell. Res.**, 112: 265-273. (1978).
- Lee, G., Bendayan, R. *Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders.* **Pharm. Res.**, 1: 1313-1330. (2004).
- Lemontt, J.F., Azzaria, M., Gros, P. *Increased mdr gene expression and decreased drug accumulation in multidrug-resistant human melanoma cells.* **Cancer Res.**, 48: 6348-6353. (1988).
- Leuschner, I., Harms, D., Mattke, A., Koscielniak, E., Treuner, J. *Rhabdomyosarcoma of the urinary bladder and vagina: a clinicopathologic study with emphasis of recurrent disease: a report of the Kiel Pediatric Tumor Registry and the German CWS Study.* **Am. J. Surg. Pathol.**, 25: 856-864. (2001).
- Leuschner, I., Heuer, T., Harms, D. *Induction of drug resistance in human rhabdomyosarcoma cell lines is associated with increased maturation: possible explanation for differentiation in recurrences.* **Pediatr. Devel. Pathol.**, 5: 276-282. (2002).
- Levine, A. *p53, the cellular gatekeeper for growth and division.* **Cell**, 88: 323-331. (1997).
- Levine, A., Holzmayer, T.A., Roninson, I.B., Das Gupta, T.K. *MDR expression in metastatic malignant melanoma.* **J. Surg. Res.**, 54: 621-624. (1993).
- Li, C.Y., Huang, Q., Kung, H.F. *Cytokine and immuno-gene therapy for solid tumors.* **Cell Mol. Immunol.**, 2: 81-91. (2005).
- Li, G., Ali, S.A., McArdle, X.E., Mian, S., Ahmad, M., Miles, A., Rees, R.C. *Immunity to tumour antigens.* **Curr. Pharm. Des.**, 11: 3501-3509. (2005).
- Ikuta, K., Takemura, K., Sasaki, K. *Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells.* **Biol. Pharm. Bull.**, 28: 707-712. (2005).

- Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovitch, L., Riordan, R. *Multidrug-resistance phenotype in chinese hamster ovary cells*. **Cancer Treat. Rep.**, 67: 869-874. (1983).
- List, A.F., Kopecky, K.J., Willman, C.L. *Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study*. **Blood**, 98: 3212-3120. (2001).
- Loe, D.W., Deeley, R.G., Cole, S.P.C. *Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP*. **Eur. J. Cancer**, 32: 945-947. (1996).
- Lynch, B.J., Guinee, D.G., Holden, J.A. *Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of proliferation in invasive breast cancer*. **Human Pathol.**, 28: 1180-1188. (1997).
- MacLellan, L.I., Wolf, C.R. *Glutathione and glutathione-dependent enzyme in cancer drug resistance*. **Drug Resist. Update**, 2: 153-164. (1999).
- Manara, M.C., Perdichizzi, S., Serra, M., Pierini, R., Benini, S., Hattinger, C.M., Astolfi, A., Bagnati, CM., D'Incalci, M., Picci, P., Scotlandi, K. *The molecular mechanisms responsible for resistance to ET-743 (Trabectedin; Yondelis) in the Ewing's sarcoma cell line, TC-71*. **Int. J. Oncol.**, 27: 1605-1616. (2005).
- Martin-Orozco, E., Ferragut, JA., Garcia-Penarrubia, P., Ferrer-Montiel. *Acquisition of multidrug resistance by L1210 leukemia cells decreases their tumorigenicity and enhances their susceptibility to the host immune response*. **Cancer Immunol. Immunother.**, 54: 328-336. (2005).
- Masci, AM., Scala, S., Racioppi, L., Zappacosta, S. *Cell surface expression of major histocompatibility class I antigens is modulated by P-glycoprotein transporter*. **Human Immunol.**, 42: 245-253. (1995).
- Matsui, I., Tanimura, M., Kobayashi, N., Sawada, T., Nagahara, N., Akatsuka, J. *Neurofibromatosis type 1 and childhood cancer*. **Cancer**, 72: 2746-2754. (1993).
- Matsumoto, J., Kunishio, K., Nagao, S. *Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide resistant mutants of human glioma cell line*. **J. Neurocol.**, 45: 37-46. (1999).

- Melguizo, C., Prados, J., Marchal, J.A., Aranega, A.E., Alvarez, L., Aranega, A. *Low concentrations of actinomycin D cause potentially therapeutic differentiation in human rhabdomyosarcoma cell line RD.* **Pathol. Res. Pract.**, 192: 188-194. (1996).
- Mercer, R.R., Mastro, A.M. *Cytokines secreted by bone-metastatic breast cancer cells alter the expression pattern of f-actin and reduce focal adhesion plaques in osteoblasts through PI3K.* **Exp. Cell Res.**, 310: 270-281. (2005).
- Merlino, G., Helman, L.J. *Rhabdomyosarcoma-working out the pathways.* **Oncogene**, 18: 5340-5348. (1999).
- Miettinen, M., Letho, V.P., Bradley, R.A., Virtanen, I. *Alveolar Rhabdomyosarcoma. Demonstration of the muscle type of intermediate filament protein, desmin as a diagnostic aids.* **Am. J. Pathol.**, 108: 246-251. (1982).
- Milligan, R.A., Whittaker, M., Safer, D. *Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites.* **Nature**, 348: 217-221. (1990).
- Miner, J.H., Wold, B. *Herculin, a fourth member of the MyoD1 family of regulatory genes.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 1098-1093. (1990).
- Mirski, S.E.L., Gerlach, J.H., Cole, S.P.C. *Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin.* **Cancer Res.**, 47: 2594-2598. (1987).
- Miser, J.S., Kinsella, T.J., Triche, T.J., Tsokos, M., Jarosinski, P., Forquer, R., Wesley, R., Magrath, I. *Ifosfamide with mesna uroprotection and etoposide: an effective regimen in the treatment of recurrent sarcomas and other tumors of children and young adults.* **J. Clin. Oncol.**, 5: 1191-1198. (1987).
- Miwa, T., Kedes, L. *Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin gene.* **Mol. Cell. Biol.**, 7: 2803-2813. (1987).
- Miyazaki, M., Kohno, K., Saburi, Y. *Drug resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in Chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase  $\pi$  gene.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 166: 1358-1364. (1990).

- Mocellin, S., Marincola, F.M., Young, H.A. *Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint*. **J. Leukoc. Biol.**, 2005 (In press).
- Montaudon, D., Pourquier, P., Denois, F., de Tinguy-Moreaud, E., Lagarde, P., Robert, J. *Differential stabilization of topoisomerase II-DNA cleavable complexes by doxorubicin-resistant rat glioblastoma cells*. **Eur. J. Biochem.**, 245: 307-315. (1997).
- Moulton, T.A., Jiang, H., Guarini, L., Fetell, M.R., Fisher, P.B. *Induction of growth suppression and modification of gene expression in multidrug-resistant human glioblastoma multiforme cells by recombinant human fibroblast and immune interferon*. **Int. J. Cancer**, 51: 373-378. (1992).
- Müller, M., Meijer, C., Zaman, G.J.R. *Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 13033-13037. (1994).
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M. *p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs*. **J. Exp. Med.**, 188: 2033-2045. (1998).
- Murphy, R. *A Contraction of muscle cells*. In: **Physiology**. Berne, R.M., Levy, M.N. (eds.). St. Louis. C. V. Mosby. 359-386. (1983)
- Nag, S., Fernandes, P.S., Martinez-Monge, R., Ruymann, R.B. *Use of brachytherapy to preserve function in children with soft-tissue sarcomas*. **Oncology**, (Huntingt) 13: 361-369; discussion 369-370, 373-374. (1999).
- Nag, S., Shasha, D., Janjan, N., Petersen, I., Zaider, M. *The American Brachytherapy Society recommendations for brachytherapy of soft tissue sarcomas*. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 49: 1033-1043. (2001).
- Nakagawa, M., Emoto, A., Nasu, N., Hanada, T., Kuwano, M., Cole, S.P., Nombra, Y. *Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer*. **J. Urol.**, 157: 1260-1264. (1997).

- Neefjes, J.J., Momburg, F., Hammerling, G.J. *Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter.* **Science**, 261: 769-777. (1993).
- Neville, H.L., Andrassy, R.J., Lobe, T.E., Bagwell, C.E., Anderson, J.R., Womer, R.B., Crist, W.M., Wiener, E.S. *Preoperative staging, prognostic factors, and outcome for extremity rhabdomyosarcoma: a preliminary report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV (1991-1997).* **J. Pediatr. Surg.**, 35: 317-321. (2000).
- Newton, W.A.Jr., Gehan, E.A., Webber, B.L., Marsden, H.B., van Unnik, A.J., Hamoudi, A.B., Tsokos, M.G., Shimada, H., Harms, D., Schmidt, D. *Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification-an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study.* **Cancer**, 76: 1073-1085. (1995).
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. *Life and death decisions.* **Science**, 299, 214-215.(2003).
- Nigro, K.G. *Cytodifferentiation, but not resolution, of embryonal rhabdomyosarcoma.* **Pediatr. Dev. Pathol.**, 7:398-399. (2004).
- Nitiss, J.L., Beck, W.T. *Antitopoisomerase drug action and resistance.* **Eur. J. Cancer**, 32A: 958-966. (1996).
- Offer, G. *The molecular basis of muscular contraction.* In: **Companion to Biochemistry.** Bull, A.T., Lagnado, J.R., Thomas, J.O., Tipton, D.R. (eds). New York. pp. 623-671. (1974).
- Olson, E.N. *MyoD1 family. A paradigm for development?* **Genes Dev.**, 4: 1454-1461. (1990).
- Ortega, J.A., Rowland, J., Monforte, H., Magologowkin, M., Triche, T. *Presence of well-differentiated rhabdomyoblasts at the end of therapy for pelvic rhabdomyosarcoma: implications for the outcome.* **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 22: 106-111. (2000).
- Osborn, M., Weber, K. *Intermediate filament proteins. A multigene family distinguishing major cell lineages.* **Trends. Biochem. Sci.**, 11: 469-472. (1986).

- Osborn, M., Weber, K. *Tumor diagnosis by intermediate filaments typing: a novel tool for surgical pathology*. **Lab. Invest.**, 48: 372-394. (1983).
- Otten, J., Flamant, F., Rodary, C., Brunat-Mentigny, M., Dutou, L., Olive, D., Quintana, E., Voute, P.A. *Treatment of rhabdomyosarcoma and other malignant mesenchymal tumours of childhood with ifosfamide + vincristine + dactinomycin (IVA) as front-line therapy (a SIOP study)*. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 24 (Suppl 1): S30. (1989).
- Pappo, A.S., Crist, W.M., Kuttesch, J., Rowe, S., Ashmun, R.A., Maurer, H.M., Newton, W.A., Asmar, L., Luo, X., Shapiro, D.N. *Tumor-cell DNA content predicts outcome in children and adolescents with clinical group III embryonal rhabdomyosarcoma. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Committee of the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group*. **J. Clin. Oncol.**, 11: 1901-1905. (1993).
- Pappo, A.S., Etcubanas, E., Santana, V.M., Rao, B.N., Kun, L.E., Fontanesi, J., Roberson, P.K., Bowman, L.C., Crist, W.M., Shapiro, D.N. *A phase II trial of ifosfamide in previously untreated children and adolescents with unresectable rhabdomyosarcoma*. **Cancer**, 71: 2119-2125. (1993).
- Pappo, A.S., Lyden, E., Breneman, J., Wiener, E., Teot, L., Meza, J., Crist, W., Vietti, P. *Up-front window trial of topotecan in previously untreated children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma: an intergroup rhabdomyosarcoma study*. **J. Clin. Oncol.**, 19: 213-219. (2001).
- Pappo, A.S., Anderson, Jr., Crist, W.M., Wharam, M.D., Breitfeld, P.P., Hawkins, D., Raney, R.B., Womer, R.B., Parham, D.M., Qualman, S.J., Grier, H.E. *Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group*. **J. Clin. Oncol.**, 17: 3487-3493. (1999).
- Pappo, A.S., Meza, J.L., Donaldson, S.S., Wharam, M.D., Wiener, E.S., Qualman, S.J., Maurer, H.M., Crist, W.M. *Treatment of localized nonorbital, nonparameningeal head and neck rhabdomyosarcoma: lessons learned from intergroup rhabdomyosarcoma studies III and IV*. **J. Clin. Oncol.**, 21: 638-645. (2003).
- Parham, D.M. *Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies*. **Mod. Pathol.**, 14: 506-514. (2001).

- Paul, W.E. In: **Fundamental Immunology** (4<sup>a</sup> ed.), Philadelphia-Nueva York: Lippincott y Raven Publishers. (1999).
- Paulino, A.C. *Role of radiation therapy in parameningeal rhabdomyosarcoma.* **Cancer Invest.**, 17: 223-230. (1999).
- Peralta, Z.O., Madrid, M.V., Nicolini, H. Citocinas multifuncionales: biología molecular de IL-1, IL-2, IL-6, TNF. **Rev. Mexic. Reumatol.**, 8: 146-155. (1993).
- Perry, S.V. *The regulation of contractile activity in muscle.* **Biochem. Soc. Trans.**, 7: 593-597. (1979).
- Potter, J.D., Johnson, D.A. *Troponin.* In: **Calcium and Cell Function.** Cheung W.Y. (ed.). New York: Academic. pp 145-173. (1982).
- Prados, J., Melguizo, C., Fernández, J.E., Aránega, A.E., Alvarez, L., Aranega A. *Inverse expression of *mdr 1* and *c-myc* genes in a human rhabdomyosarcoma cell line resistant to actinomycin D.* **J. Pathol.**, 180: 85-89. (1996).
- Prados, J., Melguizo, C., Marchal, J.A., Velez, C., Alvarez, L., Aranega, A. *Therapeutic differentiation in a human rhabdomyosarcoma cell line selected for resistance to actinomycin D.* **Int. J. Cancer**, 75: 379-383. (1998).
- Prados, J., Melguizo, C., Marchal, J.A., Velez, C., Alvarez, L., Aranega, A. *Multidrug resistance phenotype in the RMS-GR human rhabdomyosarcoma cell line obtained after polychemotherapy.* **Japan J. Cancer Res.**, 90: 1-6. (1999).
- Ramnath, N., Tan, D., Li, Q., Hylander, B.L., Bogner, B.L., Bogner, P., Ryes, L., Ferrone, S. *Downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival?* **Cancer Immunol. Immunoth.**, 27: 1-9. (2005).
- Raney, R.B., Anderson, J.R., Andrassy, R.J., Crist, W.M., Donaldson, S.S., Maurer, H.M. *Soft-tissue sarcomas of the diaphragm: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group from 1972 to 1997.* **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 22: 510-514. (2000).



- Raney, R.B., Anderson, J.R., Kollath, J., Vassilopoulou-Sellin, R., Klein, M.J., Heyn, R., Glicksman, A.S., Wharam, M., Crist, W.M., Maurer, H.M. *Late effects of therapy in 94 patients with localized rhabdomyosarcoma of the orbit: Report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)-III, 1984-1991. Med. Pediatr. Oncol.*, 34: 413-420. (2000).
- Raney, R.B., Anderson, J.R., Barr, F.G., Donaldson, S.S., Pappo, A.S., Qualman, S.J., Wiener, E.S., Maurer, H.M., Crist, W.M. *Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 23: 215-220. (2001).
- Raney, R.B., Meza, J., Anderson, J.R., Fryer, C.J., Donaldson, S.S., Breneman, J.C., Fitzgerald, T.J., Gehan, E.A., Michalski, J.M., Ortega, J.A., Qualman, S.J., Sandler, E., Wharam, M., Wiener, E.S., Maurer, H.M., Crist, W.M. *Treatment of children and adolescents with localized parameningeal sarcoma: experience of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group protocols IRS-II through -IV, 1978-1997. Med. Pediatr. Oncol.*, 38: 22-32. (2002).
- Raney, R.B. *Soft-tissue sarcoma in childhood and adolescence. Curr. Oncol. Rep.*, 4: 291-298. (2002).
- Reed, J.C. *Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. Curr. Opin. Oncol.*, 7: 541-546. (1995).
- Ries, L.A., Kosaey, C.L., Hankey, B.F. *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 15: (2005).
- Ritz, U., Drexler, I., Sutter, D., Abele, R., Huber, C., Seliger, B. *Impaired transporter associated with antigen processing (TAP) function attributable to a single amino acid alteration in the peptide TAP subunit TAP1. J. Immunol.*, 170: 941-946. (2003).
- Robson, R.M., Zeece, M.G. *Comparative studies of  $\alpha$ -actinin from porcine cardiac and skeletal muscle. Biochem. Biophys. Acta*, 295: 208-224. (1973).
- Roca, J. *The mechanism of DNA topoisomerases. Trends Biochem. Sci.*, 20: 156-160. (1994).

- Rodriguez-Galindo, C., Crews, K.R., Stewart, C.E., Furman, W., Panetta, J.C., Daw, N.C., Cain, A., Tan, M., Houghton, P.H., Santana, V.M. *Phase I study of the combination of topotecan and irinotecan in children with refractory solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol.*, 57:15-24.(2005).
- Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.W., Gottesman, M.M., Pastan, I. *Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinomas cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4538-4542. (1986).
- Rosenberg, S., Stracher, A., Burrridge, K. *Isolation and characterization of a calcium-sensitive alpha-actinin-like protein from human platelet cytoskeletons. J. Biol. Chem.*, 256: 12986-12991. (1981).
- Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., Komano, T. *Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. J. Biol. Chem.*, 268: 6077-6080. (1993).
- Safa, A.R. *Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, 4: 1-17. (2004).
- Sakaeda, T., Nakamura, T., Okumura, K. *Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy. Curr. Top Med. Chem.*, 4: 1385-1398. (2004).
- Saleh, F., Renno, W., Klepacek, I., Ibraim, G., Asfar, S., Dashti, H., Romero, P., Dashti, A., Behbehani, A. *Melanoma immunotherapy: past, present, and future. Curr. Pharm. Des.*, 11: 3461-3473. (2005).
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. In: **Molecular Cloning. A Laboratory Manual** (3<sup>a</sup> ed). Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2001).
- San Miguel-Fraile, P., Carrillo-Gijon, R., Rodriguez-Peralto, J.L., Badiola JA. *Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in childhood rhabdomyosarcoma. Am. J. Clin. Pathol.*, 121: 358-365. (2004).

- Sandler, E., Lyden, E., Ruymann, F., Maurer, H., Wharam, M., Parham, D., Link, M., Crist, W. *Efficacy of ifosfamide and doxorubicin given as a phase II "window" in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group.* **Med. Pediatr. Oncol.**, 37: 442-448. (2001).
- Santin, A.D., Bellone, S., Roman, J.J., Burnett, A., Cannon, M.J., Pecorelli, S. *Therapeutic vaccines for cervical cancer: dendritic cell-based immunotherapy.* **Curr. Pharm. Des.**, 11: 3485-3500. (2005).
- Sauna, Z.E., Smith, M.M., Muller, M. *The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein.* **J. Bioenerg. Biomembr.**, 33: 481-491. (2001).
- Scagliotti, G.V., Novello, S., Selvaggi, G. *Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer.* **Ann. Oncol.**, 10: 83-86. (1999).
- Scheper, R.J., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Kaaijk, P., Dalton, W.S., Vanhegningen, T.H.M., van Kalken, C.K., Slovack, M.L., de Vries, E.G., van der Valk, P. y cols. *Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.* **Cancer Res.**, 53: 1475-1479. (1993).
- Schneider, M.D., Olson, E.N. *Control of myogenic differentiation by cellular oncogenes.* **Mol. Neurobiol.**, 2: 1-38. (1988).
- Schuck, A., Mattke, A.C., Schmidt, B., Kunz, D.S., Harms, D., Knietig, R., Treuner, J., Koscielniak, E. *Group II rhabdomyosarcoma and rhabdomyosarcomalike tumors: is radiotherapy necessary?* **J. Clin. Oncol.**, 22: 143-149. (2004).
- Schwartz, R.J., Rothblum, K.N. *Gene switching in myogenesis: differential expression of the actin multigene family.* **Biochemistry**, 19: 5883-5889. (1981).
- Sedlack, J., Hunakova, L., Sulikova, M., Chorvath, B. *Protein kinase inhibitor-induced alterations of drug uptake, cell cycle and surface antigen expression in human multidrug-resistant (Pgp and MRP) promyelocytic leukemia HL-60 cells.* **Leuk. Res.**, 21: 449-458. (1997).

- Seliger, B., Dunn, T., Schwenzer, A., Casper, J., Huber, C., Schmoll, H.J.: *Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression and their upregulation by IFN-gamma.* **Scand. J. Immunol.**, 46: 625. (1997).
- Seliger, B., Höhne, A., Kuth, A. *Analysis of the mayor histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: Evidence for deficiencies associated with transformation and progression.* **Cancer Res.**, 56: 1756. (1996).
- Shah, D.M., Hightower, R.C., Meagher, R.B. *Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 79: 1022-1026. (1982).
- Sharma, C.R., Inoue, S., Roitelman, J., Schimke, T.T., Simoni, R.D. *Peptide transport by the multidrug resistance pump.* **J. Biol. Chem.**, 267: 5731-5734. (1992).
- Shen, Y.Q., Zhang, J.Q., Miao, F.Q., Zhang, J.M., Jiang, Q., Chen, H., Shan, X.N., Xie, W. *Relationship between the downregulation of HLA class I antigen and clinicopathological significance in gastric cancer.* **World J. Gastroenterol.**, 3628-2631. (2005).
- Shoshan, S.H., Admon, A. *MHC-bound antigens and proteomics for novel target discovery.* **Pharmacogenomics**, 5: 845-859. (2004).
- Slovak, M.L., Ho, J.P., Bhardwaj, G., Kurz, E.U., Deeley, R.G., Cole, S.P.C. *Localization of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines.* **Cancer Res.**, 53: 3221-3225. (1993).
- Slovak, M.L., Lothstein, L., Horwitz, S.B., Trent, J.M. *Molecular/cytogenetic alterations accompanying the development of multidrug resistance in the J774.2 murine cell line.* **Leukemia**, 2: 453-458. (1998).

- Smith, L.M., Anderson, J.R., Qualman, S.J., Crist, W.M., Paidas, C.N., Teot, L.A., Pappo, A.S., Link, M.P., Grier, H.E., Wiener, E.S., Breneman, J.C., Raney, R.B., Maurer, H.M., Donaldson, S.S. *Which patients with microscopic disease and rhabdomyosarcoma experience relapse after therapy? A report from the soft tissue sarcoma committee of the children's oncology group.* **J. Clin. Oncol.**, 19: 4058-4064. (2001).
- Sommer, J.R., Jennings, R.B. *Ultrastructure of cardiac muscle.* In: The Heart and Cardiovascular System. Fozzard, H.A. (ed.). New York. Raven Press. pp. 61-100. (1986).
- Sorensen, P.H., Lynch, J.C., Qualman, S.J., Tirabosco, R., Lim, J.F., Maurer, H.M., Bridge, J.A., Crist, W.M., Triche, T.J., Barr, F.G. *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group.* **J. Clin. Oncol.**, 20: 2672-2679. (2002).
- Spren, M., Babic, D., Abramic, M. *Glutathione and glutathione S-Transferases as early markers for ovarian carcinomas: case series.* **Croat Med. J.**, 42: 624-629. (2001).
- Spunt, S.L., Lobe, T.E., Pappo, A.S., Parham, D.M., Wharam, M.D. Jr., Arndt, C., Andersen, J.R., Crist, W.M., Paidas, C., Wiener, E., Andrassy, R.J., Schwartz. *Aggressive surgery is unwarranted for biliary tract rhabdomyosarcoma.* **J. Pediatr. Surg.**, 35: 309-316. (2000).
- Staibano, S., Franco, R., Mezza, E., Lo Muzio, L., Strianese, D., Errico, M.E., Bufo, P., Ferrara, G., Somma, P., Mansueto, G., Greco, I., Fiorillo, A., Bonavolonta, G., De Rosa, G. *Orbital rhabdomyosarcoma: relationship between DNA ploidy, p53, bcl-2, MDR-1 and Ki67 (MIB1) expression and clinical behavior.* **Anticancer Res.**, 24: 249-257. (2004).
- Stam, R.W., van den Heuvel-Eibrink, M.M., den Boer, M.L., Ebus, M.E., Janka-Schaub, G.E., Allen, J.D., Pieters, R. *Multidrug resistance genes in infant acute lymphoblastic leukemia: Ara-C is not a substrate for the breast cancer resistance protein.* **Leukemia**, 18: 78-83. (2004).

- Stewart, R.J., Martelli, H., Oberlin, O., Rey, A., Bouvet, N., Spicer, R.D., Godziski, J., Steven, M.C. *Treatment of children with nonmetastatic paratesticular rhabdomyosarcoma: results of the Malignant Mesenchymal Tumors studies (MMT 84 and MMT 89) of the International Society of Pediatric Oncology.* **J. Clin. Oncol.**, 21: 793-798. (2003).
- Stierle, V., Laigle, A., Jolles, B. *Modulation of MDR1 gene expression in multidrug resistant MCF7 cells by low concentrations of small interfering RNAs.* **Biochem. Pharmacol.**, 70: 1424-1430. (2005).
- Suitters, A., Marlene, R., Higgins, A., Yacoub, M.H. *MHC antigen expression in sequential biopsies from cardiac transplant patients-correlation with rejection.* **Clin. Exp. Immunol.**, 69: 575-582. (1987).
- Supino, R., Prosperi, E., Formelli, F., Mariani, M., Parmiani, G. *Characterization of a doxorubicin-resistant murine melanoma line: studies on cross-resistance and its circumvention.* **Br. J. Cancer**, 54: 33-422. (1986).
- Suzuki, A., Goll, D.E., Singh, I., Allen, R.E., Robson, R.M., Stromer, M.H. *Some properties of purified skeletal muscle alpha-actinin.* **J. Biol Chem.**, 251: 6860-6870. (1976).
- Takeshita, H., Gebhardt, MC., Apringfield, DS., Kusuzaki, K., Mankin, HJ. *Experimental Models for the Study of Drug Resistance in Osteosarcoma: P-Glycoprotein-Positive, Murine Osteosarcoma Cell Lines.* **J. Bone Joint Surg.**, 78: 366-375. (1996).
- Taki, T., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Hayakawa, T. *In vivo etoposide-resistant C6 glioma cell line: significance of altered DNA topoisomerase II activity in multi-drug resistance.* **J. Neuro. Oncol.**, 36: 41-53. (1998).
- Tang, XQ., Bi, H., Feng, JQ., Cao, JG. *Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR.* **Acta Pharmacol. Sin.**, 26: 1009-1016. (2005).
- Taniguchi, K., Wakabayashi, T., Yoshida, T., Mizuno, M., Yoshikawa, K., Kikuchi, A., Nakashima, N., Yoshida, J. *Immunohistochemical staining of DNA topoisomerase II alpha in human gliomas.* **J. Neurosurg.**, 91: 477-482. (1999).

- Tanzarella, S., Lionello, I., Valentinis, B., Russo, V., Lollini, PL., Trversari, C., Taylor, K.A., Amos, L.A. *A new model for the geometry of the binding of myosin crossbridges to muscle thin filaments.* **J. Mol. Biol.**, 147: 297-324. (1981).
- Taylor, K.A., Amos, L.A. *A new model for the geometry of the binding of myosin crossbridges to muscle thin filaments.* **J. Mol. Biol.**, 147: 297-324. (1981).
- Tew, K.D. *Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.* **Cancer Res.**, 54: 4313-4320. (1994).
- Thomas, H., Coley, H.M. *Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein.* **Cancer Control**, 10. 159-165. (2003).
- Thornell, L.E., Johansson, B., Eriksson, A., Lehto, V.P., Virtanen, I. *Intermediate filament and associate proteins in the human heart: An immunofluorescence study of normal and pathological hearts.* **Eur. Heart. J.**, 5: 231-241. (1984).
- Tishler, D.M., Raffel, C. *Development of multidrug resistance in a primitive neuroectodermal tumor cell line.* **J. Neurosurg.**, 76: 502-506. (1992).
- Tognon, G., Bernasconi, S., Celli, N. *Induction of Resistance to Aclidrin(R) in a Human Ovarian Cancer Cell Line Related to MDR Expression.* **Cancer Biol. Ther.**, 8: 4-12. (2005).
- Tokuyasu, K.T. *Visualization of longitudinally-oriented intermediate filaments in frozen sections of chicken cardiac muscle by a new staining method.* **J. Cell. Biol.**, 97: 562-565. (1984).
- Tonin, P.N., Scrable, H., Shimada, H., Cavenee, W.K. *Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development.* **Cancer Res.**, 51: 5100-5106. (1991).
- Toppmeyer, D., Seidman, A.D., Pollak, M. *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.**, 8: 670-678. (2002).

- Toth, K., Vaughan, M.M., Peress, N.S., Slocum, H.K., Rustum, Y.M. *MDR1/P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors.* **Am. J. Pathol.**, 149: 853-858. (1996).
- Townsend, D.M., Tew, K.D. *The role of glutathione-S-transferase en anti-cancer drug resistance.* **Oncogene**, 22: 7369-7375. (2003).
- Trock, B. J., Leonessa, F., Clarke, R. *Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance.* **J. Natl. Cancer. Inst.**, 89: 917-931. (1997).
- 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 with verapamil.* **Tumor Cancer Res.**, 41: 1967-1972. (1981).
- Tweddle, D.A., Pearson, A.D.J., Haber, M., Norris, M.D., Xue, C., Flemming, C., Lunec, J. *The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma.* **Cancer Letters**, 197: 93-98. (2003).
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan, I. *Expression of a full length cDNA for the human mdr 1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastin.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 3004-3011. (1987).
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Romano, T., Hori, R. *Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone.* **J. Biol. Chem.**, 267: 24248-24252. (1992).
- Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Nakamura, T., Kuwano, M., Ohtani, H., Sawada, Y. *Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein.* **Eur. J. Pharmacol.**, 408: 1-10. (2000).
- Vaidya, T.B., Weyman, C.M., Teegarden, D., Ashendel, C.L., Taparowsky, E.J. *Inhibition of myogenesis by the H-ras oncogene: implication of a role for protein kinase C.* **J. Cell. Biol.**, 114: 809-820. (1991).



- Van der Heuvel, A., Eibrink, M.M., Sonneveld, P., Pieters, R. *The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia.* **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, 38: 94-110. (2000).
- Van Horn, R., Crow, M.T. *Fast myosin heavy chain expression during the early and late embryonic stages of chicken skeletal muscle development.* **Dev. Biol.**, 134: 279-288. (1989).
- Van Loo, G., Saelens, X., Van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., Vandenamee, P. *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.* **Cell Death Differ.**, 9: 1031-1042. (2002).
- Vandekerckhove, J., Weber, K. *At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.* **J. Mol. Biol.**, 126: 783-802. (1978).
- Vilcek, J., Feldmann, M. *Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics.* **Trends Pharmacol. Sci.**, 25:201-209. (2004).
- Virtanen, I., Kurkinen, M., Letho, V.P. *Nucleus-anchoring cytoskeletal in chicken red blood cells.* **Cell. Biol. Int. Rep.**, 3: 157-162. (1979).
- Walterhouse, D.O., Lyden, E.R., Breitfeld, P.P., Qualman, S.J., Wharam, M.D., Meeyer, W.H. *Efficacy of topotecan and cyclophosphamide given in a phase II window trial in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a Children's Oncology Group study.* **J. Clin. Oncol.**, 22: 1398-403. (2004).
- Wang, K. *Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Review and hypothesis.* In: **Cell and Muscle Motility.** Shay, J.W. (ed). New York. Plenum Press. pp. 315-369. (1985).
- Warber, K.D., Potter, J.D. *Contractile proteins and phosphorylation.* In: **The Heart and Cardiovascular System.** I. Fozzard, H.A., Haber, E., Jennings, R.B., Katz, A.M., Morgan, H.E. (eds.). New York. Raven Press. pp. 779-786. (1986).
- Weber-Hall, S., Anderson, J., Mcmanus, A., Abe, S., Nojima, T., Pinkerton, R., Pritchard-Jones, K., Shipley, J. *Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization.* **Cancer Res.**, 56 (14): 3220-4. (1996).

- Wedding, U., Bokemeyer, C., Meran, J.G. Elderly Patients with Acute Myeloid Leukaemia: *Characteristics in Biology, Patients and Treatment. Recommendations of the Working Group Geriatric Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (DGHO), the Austrian Society for Haematology and Oncology (ÖGHO) and the German Society for Geriatrics (DGG)*. **Onkologie**, 27: 72-82. (2004).
- Weigel, B.J., Breitfeld, P.P., Hawkins, D., Crist, W.M., Bakers, K.S. *Role of high-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue in the treatment of metastatic or recurrent rhabdomyosarcoma*. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 23: 272-276. (2001).
- Weinstein, RS., Jakate, SM., Dominguez, JM., Lebovitz, MD., Koukoulis, GK., Kuszak, JR., Klusens, LF., Grogan, TM., Saclarides, TJ., Roninson, IB., Conn, JS. *Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis*. **Cancer Res.**, 51: 2720-2726. (1991).
- Wharam, M.D., Anderson, J.R., Laurie, F. *Failure-free survival for orbit rhabdomyosarcoma patients on intergroup rhabdomyosarcoma study IV (IRS-IV) is improved compared to IRS-III*. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, 16: A1864, 518a. (1997).
- Wilson, W.H., Jamis-Dow, C., Bryant, G., Balis, F.M., Klecker, R.W., Bates, S.E., Chabner, B.A., Steinberg, S.M., Kohler, D.R., Wittes, R.E. *Phase I and pharmacokinetic study of the multidrug resistance modulator dexverapamil with EPOCH chemotherapy*. **J. Clin. Oncol.**, 13: 1985-94. (1995).
- Woessner, R.D., Chung, T.D.Y., Hofmann, G.A., Mattern, M.R., Mirabelli, C.K., Drake, F.H., Johnson, R.K. *Differences between normal and ras-transformed NIH-3T3 cells in expression of the 170 kDa and 180 kDa forms of topoisomerase II*. **Cancer Res.**, 50: 2901-2908. (1990).
- Womer, R.B., Daller, R.T., Fenton, J.G., Misers, J.S. *Granulocyte colony stimulating factor permits dose intensification by interval compression in the treatment of Ewing's sarcomas and soft tissue sarcomas in children*. **Eur. J. Cancer**, 36: 87-94. (2000).

- Wu, L., Smythe, A.M., Stinson, S.F., Mullendore LA, Monks A, Scudiero DA, Paull KD, Koutsoukos AD, Rubinstein LV, Boyrd MR. *Multidrug-resistant phenotype of disease-oriented panels of human tumor cell lines used for anticancer drug screening.* **Cancer Res.**, 52: 3029-3034. (1992).
- Yamaguchi, M., Greaser, M.L., Cassens, R.G. *Interactions of troponin subunits with different forms of tropomyosin.* **J. Ultrastruct. Res.**, 48: 33-58. (1974).
- Young, L.C., Campling, B.G., Voskoglou-Nomikos, T., Cole, S.P., Deeley, R.G., Gedrlach, J.H. *Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response.* **Clin. Cancer Res.**, 673-680. (1995)
- Yutzey, K.E., Kline, R.L., Konieczny, S.F. *An internal regulatory element controls troponin I gene expression.* **Mol. Cell. Biol.**, 9: 1397-1405. (1989).
- Zhang, Z., Wu, J.Y., Hait, W.N., Yang, J.M. *Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination.* **Mol. Pharmacol.**, 66:395-403. (2004).
- Zöchbauer, S., Schwarzingger, I., Strobl, H., Lechner, K., Pirker, R. *Relationship between MDR1 gene and surface markers in acute myeloid leukemia.* **Anticancer Res.**, 17: 749-752 (1997).

# AGRADECIMIENTOS

**Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:**

Al Profesor Luis Álvarez Guisado, por la ayuda prestada para la realización de la tesis doctoral y sobre todo por la amistad que me ha ofrecido a lo largo de todos estos años.

A la Dra. Antonia Aránega Jiménez y al Dr. Jose Carlos Prados Salazar, que sugirieron el tema de investigación y ha dirigido con permanente dedicación este trabajo de Investigación.

En general, a todos los miembros del Grupo de Investigación dirigido por la Dra. Antonia Aránega, quienes me han prestado su continuo apoyo y colaboración.

A Ana Rosa Rama y Raúl Ortiz, incorporados recientemente a la Sección de Investigación Básica Cardiovascular, y que me han ayudado en la realización de este trabajo de investigación.

A todo el personal del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Granada.

Por último, quiero expresar mi gratitud al Servicio de Análisis Clínicos y de Anatomía Patológica de la Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves y al Servicio de Oncología del Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada y al Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por haber puesto a mi disposición parte de la infraestructura y material necesario para la realización de esta tesis.