



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Participación de citocromo P450 y transportadores tipo ABC en la
resistencia a ciclofosfamida en una línea celular de
rabdomiosarcoma infantil**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

KARLA GONZÁLEZ DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. REBECA SANTES PALACIOS



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ**

SECRETARIO: **Profesor: REBECA SANTES PALACIOS**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JAVIER AXOSCO MARÍN**

2° SUPLENTE: **Profesor: SOL CASTREJÓN CARRILLO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Toxicología
Genética, Instituto Nacional de Pediatría.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Rebeca Santes Palacios

SUSTENTANTE:

Karla González Díaz



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología Genética del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Rebeca Santes Palacios, y forma parte del proyecto de investigación con número de registro INP 066/2018 “Evaluación *in vitro* del metabolismo intratumoral mediado por enzimas de Citocromo P450 y glicoproteína P en sarcomas de tejido blando infantil y su participación en el fenómeno de quimiorresistencia” con financiamiento de los Recursos Fiscales de Presupuesto Federal para Investigación del Instituto Nacional de Pediatría 2018-2020.

ÍNDICE GENERAL

1	ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	7
2	ABREVIATURAS	9
3	RESUMEN.....	12
4	INTRODUCCIÓN.....	13
5	MARCO TEÓRICO.....	14
5.1	SARCOMAS DE TEJIDO BLANDO	14
5.1.1	<i>Etiología</i>	14
5.1.2	<i>Clasificación y estadificación</i>	15
5.2	RABDOMIOSARCOMA	17
5.2.1	<i>Epidemiología</i>	18
5.2.2	<i>Clasificación</i>	18
5.2.3	<i>Tratamiento</i>	20
5.2.3.1	Cirugía.....	21
5.2.3.2	Radioterapia	22
5.2.3.3	Quimioterapia	22
5.3	QUIMIOTERAPÉUTICOS	23
5.3.1	<i>Agentes alquilantes</i>	26
5.3.1.1	Ciclofosfamida.....	27
5.4	QUIMIORRESISTENCIA	29
5.4.1	<i>Cambios en el eflujo del fármaco en la célula</i>	30
5.4.1.1	Transportadores de unión a ATP (ABC).....	31
5.4.1.1.1	ABCB1 (MDR1/glicoproteína-P)	32
5.4.1.1.2	ABCC (MRP)	33
5.4.2	<i>Cambios en el influjo del fármaco en la célula</i>	35
5.4.3	<i>Inactivación del fármaco</i>	35
5.4.3.1	Citocromo P450.....	36
5.4.3.2	Otros mecanismos de inactivación del fármaco.....	38

5.4.4	<i>Otros mecanismos de resistencia</i>	39
5.4.4.1	Cambios en el blanco terapéutico	39
5.4.4.2	Inhibición de la respuesta de daño al DNA.....	40
5.4.4.3	Evasión de apoptosis	40
5.4.4.4	Detención del ciclo celular	41
5.4.4.5	Señales pro-supervivencia	41
6	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
7	HIPÓTESIS	44
8	OBJETIVO GENERAL	44
9	MATERIALES Y MÉTODOS	45
9.1	LÍNEA CELULAR.....	45
9.2	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	45
9.3	CULTIVO CELULAR	47
9.3.1	<i>Conteo celular por exclusión de azul de tripano</i>	47
9.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA DE LA CICLOFOSFAMIDA.....	48
9.5	TRATAMIENTO CON CICLOFOSFAMIDA	49
9.6	OBTENCIÓN DE RNA Y PROTEÍNAS TOTALES	50
9.6.1	<i>Aislamiento y cuantificación del RNA total</i>	50
9.6.2	<i>Obtención y cuantificación de proteínas totales</i>	51
9.7	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	51
9.7.1	<i>Retrotranscripción</i>	51
9.7.2	<i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real</i>	52
9.8	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA	53
9.8.1	<i>Ensayo Inmuno-Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA)</i>	53
9.8.2	<i>Western blot</i>	54
9.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
10	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
10.1	CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA DE LA CICLOFOSFAMIDA.	55

10.2	EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPORAL A CICLOFOSFAMIDA.....	57
10.3	MODULACIÓN DE CYP Y TRANSPORTADORES TIPO ABC POR EXPOSICIÓN A CICLOFOSFAMIDA.....	58
10.3.1	<i>CYP2</i>	59
10.3.2	<i>CYP3A4</i>	60
10.3.3	<i>CYP3A5</i>	61
10.3.4	<i>ABCC2</i>	67
10.3.5	<i>Glicoproteína-P</i>	70
11	CONCLUSIÓN.....	73
12	PERSPECTIVAS.....	73
13	ANEXOS.....	75
13.1	EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE RNA POR ELECTROFORESIS.....	75
13.2	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY.	77
13.3	SONDAS UTILIZADAS EN PCR.	79
13.4	PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ELISA Y WESTERN BLOT.....	79
13.5	ANTICUERPOS UTILIZADOS:.....	80
13.5.1	<i>Western Blot</i>	80
13.5.2	<i>ELISA</i>	80
14	REFERENCIAS.....	81

1 ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Patrones histológicos de rabdomiosarcoma.....	20
Figura 2. Estructura química de la ciclofosfamida	27
Figura 3. Ruta del metabolismo de la ciclofosfamida.....	28
Figura 4. Estructura tridimensional de la glicoproteína-P.....	33
Figura 5. Estructura secundaria predicha para MRP1 y MRP2..	34
Figura 6. Ciclo catalítico de CYP.....	37
Figura 7. Estrategia experimental.....	46
Figura 8. Representación de los cuadrantes de una cámara de Neubauer vista en el microscopio.....	48
Figura 9. Efecto de la ciclofosfamida sobre la viabilidad de la línea celular SJCRH30....	56
Figura 10. Efecto de la exposición temporal a ciclofosfamida sobre la viabilidad de la línea celular SJCRH30.....	57
Figura 11. Curva de amplificación <i>CYP2B6</i> y <i>CYP2C9</i>	59
Figura 12. Expresión génica relativa de <i>CYP3A4</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis del tratamiento respecto al control de cada tiempo evaluado.....	61
Figura 13. Expresión génica relativa de <i>CYP3A4</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células controles de cada tiempo evaluado.....	61
Figura 14. Expresión génica relativa de <i>CYP3A4</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células tratadas de cada tiempo evaluado.....	62
Figura 15. Veces de cambio en la expresión de <i>CYP3A4</i> en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento.....	63
Figura 16. Expresión génica relativa de <i>CYP3A5</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis del tratamiento respecto al control de cada tiempo evaluado.....	64
Figura 17. Expresión génica relativa de <i>CYP3A5</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células controles de cada tiempo evaluado.....	64
Figura 18. Expresión génica relativa de <i>CYP3A5</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células tratadas de cada tiempo evaluado.....	65
Figura 19. Veces de cambio en la expresión de <i>CYP3A5</i> en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento.	65

Figura 20. Expresión proteica de CYP3A5 en células SJCRH30 expuestas a ciclofosfamida.....	66
Figura 21. Análisis de la expresión génica relativa de <i>ABCC2</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis del tratamiento respecto al control de cada día evaluado.....	67
Figura 22. Expresión génica relativa de <i>ABCC2</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células controles de cada tiempo evaluado.....	68
Figura 23. Expresión génica relativa de <i>ABCC2</i> respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células tratadas de cada día evaluado.	68
Figura 24. Veces de cambio en la expresión de <i>ABCC2</i> en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento	69
Figura 25. Expresión de glicoproteína-P en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento.	70
Figura 26. Expresión proteica de glicoproteína-P. Análisis entre las células controles de cada día evaluado	71
Figura 27. Expresión proteica de glicoproteína-P. Análisis entre las células tratadas de cada día evaluado.....	71
Figura 28. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	76
Cuadro 1. Grupos de riesgo del Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS).....	21
Cuadro 2. Descripción general de las familias de antineoplásicos.....	24
Cuadro 3. Distribución de muestras en los carriles de los geles de agarosa.....	76
Cuadro 4. Volúmenes de solución de trabajo de BSA y agua destilada necesarios para obtener la cantidad de BSA (μg) de cada punto de la curva estándar.....	77

2 ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committe on Cancer</i>
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de varianza
Apaf-1	Factor-1 activador de la proteasa apoptótica
ATP	Trifosfato de adenosina
BCRP	Proteína de resistencia a cáncer de mama
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Células control
CDK	Quinasas dependientes de ciclina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CoA	Coenzima A
CSC	Células cancerosas madre
CYP	Citocromo P450
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHFR	Inhibidor dihidrofolato reductasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo Inmuno-Absorbente Ligado a Enzimas
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gp-P, MDR1	Glicoproteína-P
GSH	Glutatión
GST	Glutatión S-transferasa

IRS	Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (Estudio del grupo interdisciplinario para el Rabdomiosarcoma)
LRP	Proteína de resistencia a cáncer de pulmón
MMR	Reparación de desapareamiento de bases
MRP, ABCC	Proteína asociada a resistencia a multifármacos
MSD	Dominio que se extiende sobre la membrana
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MTX	Metotrexato
MYOD1	Proteína de diferenciación miogénica 1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBD	Dominio de unión a nucleótido
NCOA2	Receptor nuclear del coactivador 2
NEB	Reparación de escisión de bases
NER	Reparación de escisión de nucleótidos
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PI3K	Fosfatidilinositol 3 – quinasa
PPIA	Ciclofilina A
PTK	Proteína tirosina quinasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RFC	Acarreador de folato reducido
RMS	Rabdomiosarcoma
RMSA	Rabdomiosarcoma alveolar
RMSE	Rabdomiosarcoma embrionario
RMSP	Rabdomiosarcoma pleomórfico
RMSS	Rabdomiosarcoma de células fusiformes/esclerótico
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
STAT	Transducción de señal y activación de transcripción
STB	Sarcoma de Tejido Blando

T	Células tratadas
TBE	Tris-borato-EDTA
TFG- α	Factor de crecimiento transformante α
TNF	Factor de necrosis tumoral
Sistema TNM	Sistema Tumor, Nódulos, Metástasis
Transportadores ABC	Transportadores de unión a ATP
UGT	Uridinadifosfato glucuroniltransferasa
VAC	Quimioterapia con vincristina, actinomicina-D y ciclofosfamida
VAI	Quimioterapia con vincristina, actinomicina e ifosfamida
VIE	Quimioterapia con vincristina, ifosfamida y etopósido
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana 1

3 RESUMEN

Antecedentes: El desarrollo de resistencia de las células tumorales a agentes antineoplásicos (resistencia adquirida) se considera una de las mayores causas de fallo clínico en el tratamiento de pacientes con cáncer. Algunos de los mecanismos asociados con la resistencia adquirida son cambios en la expresión o actividad de las enzimas responsables de la activación de profármacos y la inactivación de agentes citotóxicos (citocromos P450); o la disminución de la concentración intracelular del fármaco por sobreexpresión de bombas de eflujo (transportadores tipo ABC), entre otros.

Objetivo: Evaluar la participación de CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4/5, ABCC2 (MRP2) y glicoproteína-P en la resistencia adquirida a ciclofosfamida.

Materiales y métodos: Células de rabdomiosarcoma alveolar (RMS13, ATCC CRL-2061) fueron sembradas durante 7, 14, 21 y 28 días en ausencia y presencia de ciclofosfamida (2 mM). En cada periodo de tiempo se cuantificó la expresión génica de CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4/5 y ABCC2 mediante RT-PCR. Los datos de expresión génica se analizaron por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando ciclofilina A como gen endógeno y se reportan como veces de cambio respecto a las células sin tratamiento a cada tiempo evaluado. La expresión proteica de CYP3A5 y glicoproteína-P fue determinada mediante Western blot y ELISA, respectivamente.

Resultados: No se encontró diferencia significativa en los niveles de expresión de *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP3A4* y *ABCC2* de las células controles en comparación con las células tratadas. *CYP3A5* mostró alta expresión en los días 14, 21 y 28 de tratamiento; mientras que la glicoproteína-P disminuyó en los días 7 y 21.

Conclusiones: La mayor sobre-regulación de *CYP3A5* con respecto a los demás genes y proteínas evaluadas sugiere que este gen tiene mayor influencia en la resistencia adquirida a ciclofosfamida.

4 INTRODUCCIÓN

El rhabdomyosarcoma (RMS) es un tipo de sarcoma de tejido blando (STB) que, debido a que es un cáncer de formas muy tempranas de células de músculo, es mucho más común en niños. Este tumor representa alrededor del 5% de todos los tumores pediátricos¹. Los fármacos más activos para el tratamiento de STB son la ciclofosfamida, la doxorubicina y la ifosfamida, con cada uno de ellos se puede obtener un 20% de respuesta en enfermedad avanzada; sin embargo, las respuestas completas son escasas (<10% de los pacientes)².

La resistencia a los fármacos es la mayor causa de falla en la quimioterapia contra éste y otros tipos de cáncer, la cual causa recaídas de la enfermedad y/o metástasis. Sin embargo, aún no se ha encontrado ninguna estrategia universal para superar la resistencia, que se basa en mecanismos biológicos altamente complejos e individualmente variables³.

Uno de los mecanismos por los que las células tumorales desarrollan resistencia a los quimioterapéuticos es mediante la disminución intracelular del fármaco. Este mecanismo está mediado por proteínas de resistencia a multifármacos que pertenecen a la familia de transportadores de unión a ATP (ABC por sus siglas en inglés), siendo la glicoproteína-P (MDR1 o *ABCB1*) y las proteínas asociadas a resistencia a multifármacos (MRP o *ABCC*), las proteínas más frecuentemente asociadas a este fenómeno⁴.

Otro mecanismo de resistencia es la desactivación local de los antineoplásicos a través del metabolismo realizado por enzimas del citocromo P450 (CYP). La expresión aumentada en células tumorales de formas individuales de estas enzimas conlleva a la eliminación de los citostáticos sin haber ejercido en su totalidad el efecto citotóxico deseado⁵.

Por lo tanto, evaluar la participación de los citocromos P450 y los transportadores de tipo ABC en la resistencia adquirida podría ayudar a comprender los mecanismos de las células tumorales involucrados en la falla terapéutica.

5 MARCO TEÓRICO

5.1 Sarcomas de tejido blando

Los sarcomas constituyen un grupo de neoplasias que comparten ciertas características clínicas y patológicas. La mayoría se originan de estructuras derivadas del mesodermo, pero existen algunos tumores originados en el neuroectodermo o de histogénesis incierta que también se clasifican como sarcomas⁶.

Los sarcomas de tejidos blandos (STB) se originan en los tejidos adiposos, musculares, nerviosos y fibrosos; así como en los vasos sanguíneos o los tejidos profundos de la piel. Los sarcomas pueden encontrarse en cualquier parte del cuerpo, la mayoría comienzan en los brazos o en las piernas; sin embargo, también se pueden desarrollar en el tronco, la cabeza y el área del cuello, así como en los órganos internos y en el retroperitoneo⁷.

5.1.1 Etiología

La mayoría de los STB son de etiología desconocida, pero entre las causas reconocidas para su aparición se encuentran diversos factores físicos y químicos, así como algunos defectos inmunológicos hereditarios o adquiridos.

Entre los factores de riesgo descritos para padecer estas neoplasias destacan:

- A. Desórdenes hereditarios. Como el retinoblastoma, la enfermedad de Werner, el síndrome de Li-Fraumeni, la enfermedad de von Recklinghausen, la tríada de Carney, el síndrome linfedema-distiquiasis, así como las inmunodeficiencias genéticamente determinadas⁸
- B. Virus. Por ejemplo, el sarcoma de Kaposi es común en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) con hasta 70,000 veces mayor riesgo, en comparación con controles de la misma edad y población⁸.
- C. Factores de riesgo ocupacionales y ambientales. Se ha demostrado mayor incidencia de STB en agricultores y trabajadores forestales expuestos a

herbicidas fenoxiacéticos y clorofenoles. También se ha encontrado relación con aquellas ocupaciones que suponen un contacto con madera, el aserrín, el cloruro de vinilo y el arsénico inorgánico⁸.

- D. Hormonas. Estudios han demostrado la relación entre el angiosarcoma de hígado y el uso de esteroides anabolizantes androgénicos, así como entre el leiomioma y la estimulación hormonal⁸.
- E. Radiación. Se ha estimado que aproximadamente el 5% de los sarcomas se atribuyen a radiación previa. El diagnóstico se da después de un periodo de latencia largo de radiación (3-5 años) en un área que no tenía evidencia de tumor antes de este tiempo de exposición. El histiocitoma fibroso maligno es el subtipo de sarcoma más frecuentemente asociado a sarcomas inducidos por radiación. También, se ha observado la aparición de angiosarcomas después del uso de un medio de contraste radioactivo llamado Thorotrast⁸.

5.1.2 Clasificación y estadificación

Los STB se clasifican de acuerdo con el tipo y grado histológico del tejido blando al cuál se asemejan. Entre los subtipos más importantes de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud se encuentran los tumores adipocíticos, los tumores fibroblásticos/ miofibroblásticos, los tumores fibrohistiocíticos, los tumores de músculo liso y músculo esquelético, los tumores periciticos, los tumores vasculares y condro óseos, los tumores de estroma gastrointestinal y los tumores de la vaina nerviosa. Aquellas neoplasias para las cuales se desconoce el tejido normal con el cual se puede comparar se agrupan en el último grupo de tumores de diferenciación incierta⁹.

En los STB, de las cuatro localizaciones principales, solo dos (tronco y extremidades, y retroperitoneo) tienen agrupamientos por etapas¹⁰.

La estadificación se fundamenta en el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). La letra T se refiere al tamaño del tumor y la diseminación del cáncer al tejido cercano; la letra N describe la diseminación del

cáncer a los ganglios linfáticos cercanos y la letra M describe la metástasis. Los números y las letras después de las letras T, N y M proporcionan más detalles sobre cada uno de estos factores.

Una vez que se han determinado las categorías T, N y M de una persona, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general¹⁰. La etapa se describe usando el número cero (0) y los números romanos del I al IV. La etapa es útil para seleccionar el tratamiento, pero otros factores como la ubicación del sarcoma, también tienen un impacto en la planeación del tratamiento y el pronóstico¹¹.

- Etapa 0. Para la mayoría de los cánceres es *carcinoma in situ*. Esto significa que el cáncer está en una etapa muy temprana, se encuentra solamente en el área donde se originó, y no se ha propagado.
- Etapa IA (T1, N0, M0, G1 o GX): La amplitud del tumor no es mayor a 5 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos o a otras partes más distantes.
- Etapa IB (T2, N0, M0, G1 o GX): La amplitud del tumor es mayor a 5 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos o a otras partes más distantes. El cáncer es de grado 1 o el grado no pudo ser determinado.
- Etapa IIA (T1, N0, M0, G2 o G3): La amplitud del tumor no es mayor a 5 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos o a otras partes más distantes.
- Etapa IIB (T2, N0, M0, G2): La amplitud del tumor es mayor a 5 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos o a otras partes más distantes. El cáncer es de grado 2.
- Etapa III: Cualquiera de lo siguiente está presente:
 - T2, N0, M0, G3: El tumor mide más de 5 cm de ancho. No se ha propagado a los ganglios linfáticos o a otras partes más distantes. El cáncer es de grado 3.
 - Cualquier T, N1, M0 y cualquier G: El cáncer puede ser de cualquier tamaño y cualquier grado. Se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos. No se ha propagado a sitios distantes.
- Etapa IV (Cualquier G, cualquier T, cualquier N, M1): El tumor se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos al tumor y/o a lugares distantes. Puede ser de cualquier tamaño y grado.

Como se puede observar, el grado del cáncer es un factor importante en la estadificación debido a que los cánceres con un grado mayor tienden a crecer y propagarse más rápido que los de menor grado. El grado se determina sumando el puntaje de la diferenciación celular (se asigna 1 cuando las células cancerosas lucen similares a las células normales y el 3 cuando las células cancerosas lucen muy anormales), el recuento mitótico (para saber cuántas células cancerosas se están dividiendo al observarse con el microscopio; se asigna un puntaje de entre 1 y 3), y la necrosis tumoral (para ver qué tanto el tumor está compuesto de tejido muerto; con un puntaje entre 0 y 2).

Una vez determinada la suma total, se asigna el grado del cáncer de acuerdo con la siguiente clasificación:

GX: no se puede evaluar el grado debido a que la información está incompleta.

Grado 1 (G1): puntaje total de 2 ó 3.

Grado 2 (G2): puntaje total de 4 ó 5.

Grado 3 (G3): puntaje total de 6 o más.

5.2 Rabdomiosarcoma

El rabdomiosarcoma (RMS) es un tumor maligno que representa alrededor del 50% de todos los STB. El RMS es una neoplasia mesenquimatosas, es decir, una masa anormal de tejido, compuesta por células precursoras primitivas que exhiben características histológicas de la diferenciación miogénica¹², éste último es un proceso biológico bien definido que ocurre primariamente durante el desarrollo fetal y embrionario. Como resultado, estas neoplasias tienden a parecerse más a etapas de formación muscular del periodo prenatal que al postnatal. Esta semejanza no solo se manifiesta en la histopatología, sino también en estudios genéticos del proceso del desarrollo muscular. Por lo tanto, estos tumores pueden considerarse lesiones que inician la diferenciación miogénica, pero fallan al desconectar las células constituyentes del ciclo proliferativo, que normalmente apagan la diferenciación terminal¹³.

5.2.1 Epidemiología

El RMS es un tumor relativamente raro que puede presentarse a cualquier edad. Hay aproximadamente 600 casos nuevos diagnosticados por año en Estados Unidos, 41% de los cuales ocurre en adultos versus 59% de ocurrencia en niños. Estadísticamente, el RMS es poco común en adultos, ya que los STB comprenden menos del 1% de todas las neoplasias malignas, de los cuales 3% son RMS. En contraste, los STB representan el 10% de los tumores malignos pediátricos, en donde el 50% son RMS¹⁴.

La frecuencia de este cáncer en México no está bien establecida debido a que se carece de un registro nacional de neoplasias¹⁵. Sin embargo, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018), los tumores malignos de tejidos mesoteliales y de los tejidos blandos están en el quinto lugar entre las principales causas de mortalidad por tumores malignos, en la población de 0 a 17 años en nuestro país. El porcentaje de muertes observadas por cada 100 000 habitantes, en la serie anual entre 2011 y 2016, rondó entre 3.1 y 4.8%, sin una tendencia de preferencia de sexo¹⁶.

5.2.2 Clasificación

El esquema de clasificación más reciente de la OMS subdivide al RMS en cuatro subtipos, cada uno con diferentes características histológicas, genéticas y clínicas. Estos son rhabdomiocarcinoma embrionario (RMSE), rhabdomiocarcinoma pleomórfico (RMSP), rhabdomiocarcinoma de células fusiformes/esclerótico (RMSS) y rhabdomiocarcinoma alveolar (RMSA)¹⁴.

El RMSE es el subtipo más común, comprende un rango de histologías que contienen grados variables de rhabdomiogénesis de embrión¹⁷. Se caracteriza por la presencia de rhabdomioblastos, un tipo de célula que tiene núcleos excéntricos y citoplasma eosinófilo, estos rhabdomioblastos están incrustados en un estroma mixoide¹⁸ (Figura 1A). Surge generalmente en niños menores de diez años y frecuentemente se presenta en cuello, cabeza y sistema uro-genital¹⁷. Es

genéticamente heterogéneo, y está asociado con la activación de varias vías promotoras de señalización y/o de pérdida de función de genes supresores de tumores. Como subgrupo, tiene un pronóstico favorable¹⁸.

La histología del RMSA muestra una vaga semejanza con alveolos fetales como resultado de la intersección de un septo fibroso con un anidamiento interseptal y descohesivo (Figura 1B). La mayoría de los casos se presentan en adolescentes y surge en extremidades y localizaciones parameningeales¹⁷. Es notoriamente agresivo y por lo general se asocia con translocaciones cromosómicas patogónicas, t (2; 13) (q35; q14) o t (1; 13) (p36; q14), que representan el 60% y el 20% de casos de RMSA, respectivamente. Cabe destacar que aproximadamente el 20% de los RMSA carecen de evidencia citogenética o molecular de estas translocaciones y ahora son clasificados como RMSA de fusión negativa, los cuales son menos agresivos que los RMSA con fusión positiva y se comportan de manera similar al RMSE con respecto al pronóstico clínico¹⁸.

El RMSP se compone por miocitos neoplásicos, diferenciados con núcleos alargados e irregulares¹⁷ (Figura 1C). Es una neoplasia maligna que afecta a adultos, ocurriendo con mayor frecuencia en la sexta o séptima década de vida, y típicamente surge en los tejidos blandos profundos. Estas neoplasias muestran cariotipos complejos, pero sin alteraciones estructurales recurrentes. Son altamente agresivos, y la mayoría de los pacientes sufre metástasis dentro de los 5 años del diagnóstico¹⁸.

El RMSS contiene densas bandas de colágeno en su histología y se nota un patrón micro alveolar¹⁷ (Figura 1D). Éste es comparativamente poco frecuente, pero afecta tanto a niños como a adultos. En los niños, estos tumores son predominantemente paratesticulares; mientras que en los adultos se encuentran típicamente en los tejidos blandos profundos de la cabeza y el cuello. Este subtipo de rhabdomyosarcoma tiene diversas características genéticas y clínicas, en el RMS de células fusiformes congénitas e infantiles hay reubicación del receptor nuclear del coactivador 2 (NCOA2) y un pronóstico favorable, mientras que un subconjunto de RMS de células fusiformes / esclerótico en niños y adultos de mayor edad,

presenta mutaciones recurrentes en la diferenciación miogénica 1 (MYOD1), que presagia a un pobre pronóstico¹⁸.

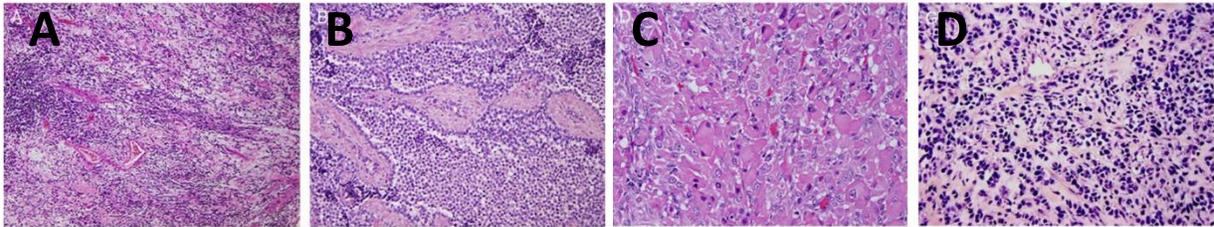


Figura 1. Patrones histológicos de rhabdomyosarcoma. A) RMSE, B) RMSA, C) RMSP, D) RMSS (Imagen adaptada de¹⁷).

5.2.3 Tratamiento

En general, el RMS es un tumor quimiosensible y más del 70% de pacientes con enfermedad no metastásica puede ser curado¹⁷. El tratamiento para el RMS es multimodal e incluye la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía. Aunque los pacientes con RMS localizados que reciben terapia combinada tienen una supervivencia a 5 años superior al 70%, la recaída y el mal resultado son comunes en los pacientes con metástasis en el momento del diagnóstico¹⁹.

El uso óptimo, el tiempo y la intensidad del tratamiento multimodal debe ser planeada de acuerdo con los factores de pronóstico conocidos, incluyendo el sitio del tumor primario, la extensión de la enfermedad, el subtipo patológico, las secuelas predictivas del tratamiento y si el niño con RMS necesita radioterapia¹⁷. Las variables del pronóstico son aquellas que se refieren al tumor (sitio, estadio, tamaño, etcétera), al paciente (edad, sexo, etcétera), o al tratamiento recibido (el tipo, la dosis y la duración). Los estudios demuestran que los factores más importantes que afectan el tratamiento son la estadificación, el sitio y subtipo patológico del tumor y la edad del paciente²⁰.

El algoritmo de tratamiento para el RMS está basado en la estadificación de riesgo, que incorpora el grupo, la etapa, la histología y la edad en el diagnóstico inicial (Cuadro 1)²¹.

Cuadro 1. Grupos de riesgo del Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)

Bajo riesgo	Etapa 1/grupo I-III con histología embrional o botrioide o estadio 2-3/grupo I-II con histología embrional o botrioide
Riesgo intermedio	Etapa 2-3/grupo III con histología embrional o botrioide o pacientes en estadio 1-3 con histología alveolar o indiferenciada
Alto riesgo ¹	Etapa 4/grupo IV

5.2.3.1 Cirugía

La cirugía es un componente integral del manejo local del RMS. El cirujano debe participar desde el principio en el diagnóstico para ayudar a determinar la estrategia para la biopsia. El grado de enfermedad es uno de los factores de pronóstico más significativos que predicen el resultado y guían la clasificación de agrupación²¹.

La variabilidad con la que el RMS se presenta en diferentes sitios anatómicos tiene un fuerte efecto en las estrategias de tratamiento. Alrededor del 40% de los RMS surgen en la cabeza y el cuello y más de un 25% en el tracto genitourinario. Tales sitios anatómicos generalmente no se prestan a un abordaje quirúrgico como procedimiento primario; la resección completa es imposible en muchos pacientes e, incluso si es posible, es poco probable que se logre sin consecuencias mayores funcionales o estéticas. Por otra parte, debido a que el RMS es un tumor quimiosensible, la resección definitiva generalmente se intenta solo después de la evaluación de la efectividad de la respuesta a la quimioterapia²⁰.

5.2.3.2 Radioterapia

Basados en las más recientes recomendaciones del IRS, todos los pacientes con la enfermedad del grupo II-IV deben recibir tratamiento de radiación²¹.

No obstante, ha habido un debate particular sobre la necesidad de usar radioterapia en el RMS pediátrico para garantizar el control local en pacientes que parecen haber logrado una remisión completa con quimioterapia y cirugía limitada. Cuando la radioterapia se implementa sistemáticamente como parte del tratamiento primario, la posibilidad de control local aumenta (pero no se garantiza) y el riesgo de recaída es menor. Sin embargo, puede provocar problemas importantes a largo plazo, especialmente en niños muy pequeños. La evidencia ahora sugiere que la terapia local podría ser evitable, o podría ser posible el uso de una intensidad más baja, dependiendo de la respuesta a la cirugía inicial y la quimioterapia primaria²⁰.

5.2.3.3 Quimioterapia

La quimioterapia con múltiples agentes se usa en el tratamiento de todos los pacientes con RMS. Los agentes activos vincristina, actinomicina y ciclofosfamida (VAC) son la columna vertebral de la quimioterapia^{20,21}. Las variaciones en VAC se basan en el grupo clínico y el sitio de la enfermedad¹⁹. Debido a este tipo de quimioterapia, las tasas de supervivencia general y sin progresión han mejorado significativamente con el tiempo²¹.

Se reconocen las respuestas del RMS a una amplia gama de medicamentos que incluyen doxorubicina, cisplatino, etopósido, ifosfamida y melfalán. La evidencia publicada para otros medicamentos en uso clínico como el carboplatino, es menos clara, pero estudios más recientes también sugieren el valor del topotecán, el irinotecán y la vinorelbina²⁰.

Además de su papel en la eliminación de la posible enfermedad micrometastásica, la quimioterapia tiene un papel importante en el control local. Las tasas de respuesta son altas, y algunos niños (alrededor del 35%) pueden lograr una respuesta completa solamente con quimioterapia después de la biopsia inicial o la cirugía parcial. Las controversias actuales se relacionan con la selección de la mejor combinación de agentes y, en particular, con la elección de un agente alquilante en lugar de las antraciclinas²⁰.

5.3 Quimioterapéuticos

Clásicamente, los fármacos antineoplásicos fueron agrupados en los utilizados para la quimioterapia, para la terapia hormonal y para la inmunoterapia. Actualmente existen nuevas terapias dirigidas hacia elementos relacionados con la carcinogénesis como la matriz extracelular y endotelial y el sistema inmune. El blanco puede estar localizado a nivel de DNA, RNA o proteínas²².

Los fármacos utilizados en la quimioterapia se incluyen dentro de un número de familias definidas por su estructura química y su mecanismo de acción, las cuáles son, en general: agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa I y II, inhibidores de la mitosis, derivados del platino²² (Cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción general de las familias de antineoplásicos.

Familia de antineoplásicos	Mecanismo de acción	Ejemplos
Agentes alquilantes	Lesionan el DNA e interfieren en la replicación celular. Ejercen su acción en todas las fases del ciclo celular ²² .	Ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, dacarbazina
Antibióticos	Sustancias naturales producidas fundamentalmente por hongos capaces de alterar el crecimiento de otras células vivas, a través de intercalarse entre las bases del DNA ²² .	Bleomicina, doxorubicina, actinomicina D.

Cuadro 2 (Continuación). Descripción general de las familias de antineoplásicos.

Familia de antineoplásicos	Mecanismo de acción	Ejemplos
Antimetabolitos	Tienen una estructura similar a las de los componentes del metabolismo intermediario celular, de modo que interfieren en su metabolismo y en concreto con la síntesis de ácidos nucleicos. Ejercen su acción principalmente sobre tumores de rápido crecimiento ²² .	Análogos de pirimidinas, análogos de purinas, análogos de adenosina, antifolatos.
Inhibidores de la topoisomerasa I y II	Interfieren con las enzimas involucradas en separar las hebras de DNA en el proceso de replicación ²³ .	Inhibidores de la topoisomerasa I: topotecán e irinotecán (CPT-11) Inhibidores de la topoisomerasa II: etopósido (VP-16) y tenipósido
Inhibidores de la mitosis	Son compuestos derivados de productos vegetales. Detienen la división celular e interfieren en todas las fases del ciclo celular, al evitar que las enzimas sinteticen las proteínas necesarias para la reproducción de las células ²³ .	Docetaxel, estramustina, paclitaxel, vinblastina, vincristina

Cuadro 2 (Continuación). Descripción general de las familias de antineoplásicos.

Familia de antineoplásicos	Mecanismo de acción	Ejemplos
Derivados del platino	Al activarse intracelularmente, quedan libres dos valencias del ión platino, que forman dos enlaces estables con componentes del DNA. El resultado es la alteración de la configuración tridimensional del DNA, la producción de errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas se separen para la replicación ²² .	Cisplatino, carboplatino

5.3.1 Agentes alquilantes

Son los fármacos más utilizados en la quimioterapia antineoplásica, lesionan el DNA e interfieren en la replicación celular. Provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en las células, especialmente las bases nitrogenadas del DNA²⁴. La alquilación sustituye un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo del agente alquilante. El lugar preferente de la alquilación es el átomo de nitrógeno 7 de la guanina²⁵. De este modo, bloquean la replicación del DNA celular y la transcripción del RNA y, por tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas. Ejercen su acción durante todo el ciclo celular, pero son más activos sobre las células en rápida división²⁴.

Los agentes alquilantes pueden formar aductos en todos los átomos de *O* y *N* en las bases nitrogenadas, así como en átomos de *O* en fosfodiésteres. El patrón de alquilación depende del agente, la posición en el DNA / RNA, y es diferente en ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios. En general, las *O*-alquilaciones son altamente mutagénicas y genotóxicas, mientras que las *N*-alquilaciones son citotóxicas, pero relativamente menos mutagénicas²⁶.

Las estructuras químicas de los agentes alquilantes son diversas, pero los agentes eficaces son los que poseen dos grupos alquilo separados, pues así realizan dos enlaces covalentes con dos guaninas. Cuando el agente posee un solo grupo alquilo, se produce una sola mutación²⁵.

Los agentes alquilantes actúan sobre el conjunto del ciclo celular, es decir, son dependientes del ciclo, pero no son dependientes de una fase en particular de este. Existe, pues, una relación entre la dosis empleada y el efecto obtenido²⁵.

Algunos ejemplos de agentes alquilantes son: ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, dacarbazina, melfalán, busulfán, entre otros²⁴. Los efectos adversos especiales son la lesión pulmonar por busulfán y la lesión de la mucosa vesical por la acroleína, que es un metabolito de la ciclofosfamida. Así mismo, se presentan afecciones típicas de los citostáticos en tejidos que tienen fisiológicamente un alto índice de mitosis, desencadenando, por ejemplo, caída de pelo, trastornos gastrointestinales, predisposición a infecciones, entre otros²⁷.

Se usan para tratar muchas clases diferentes de cánceres, incluyendo el cáncer pulmonar, el cáncer de seno y el cáncer ovárico, así como la leucemia, el linfoma, la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple y el sarcoma²³.

5.3.1.1 *Ciclofosfamida*

- Propiedades físico – químicas²⁸
 - Nombre IUPAC: N, N-bis (2-cloroetil)-2-oxo-1,3,2λ5-oxazafosforina-2-amina.
 - Fórmula molecular: C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P (Figura 2).
 - Peso molecular: 261.08 g/mol.
 - Punto de fusión: 41 – 45° C.
 - pH: en solución al 2% es de 4 a 6.

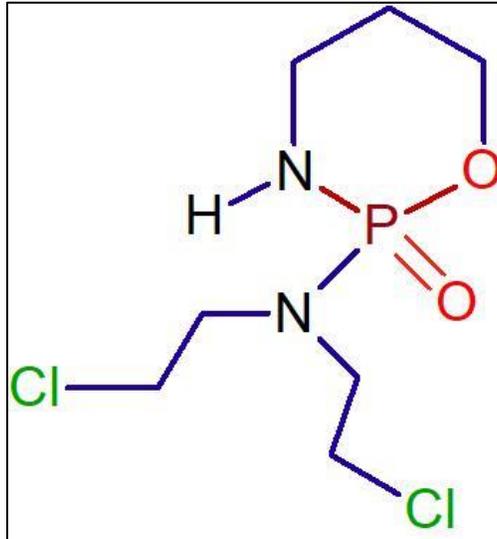


Figura 2. Estructura química de la ciclofosfamida. (Imagen adaptada de Pubchem²⁸)

- Farmacocinética²⁹
 - Absorción: Después de su administración oral, el pico de concentración ocurre en 1h.
 - Volumen de distribución: 30-50 L.
 - Unión a proteínas: 20% de la ciclofosfamida se une a proteínas con cambios no dosis-dependientes. Algunos metabolitos se unen a proteínas en un grado mayor al 60%.
 - Ruta de eliminación: Es eliminada primariamente en forma de metabolitos. 10-20% es excretada sin cambios en la orina y 4% es excretado en la bilis después de una administración intravenosa.
 - Tiempo de vida media: 3-12 h.
 - Aclaramiento: El aclaramiento total del cuerpo = 63 ± 7.6 L/kg.
 - Metabolismo, activación y desactivación:

La ciclofosfamida es un fármaco que es bioactivado por enzimas hepáticas del citocromo P450 (CYP) a 4-hidroxiciclofosfamida y posteriormente a aldofosfamida. Posteriormente, estos metabolitos se hidrolizan en la célula diana a mostaza de fosforamida (metabolito activo) y acroleína (Figura 3)³⁰.

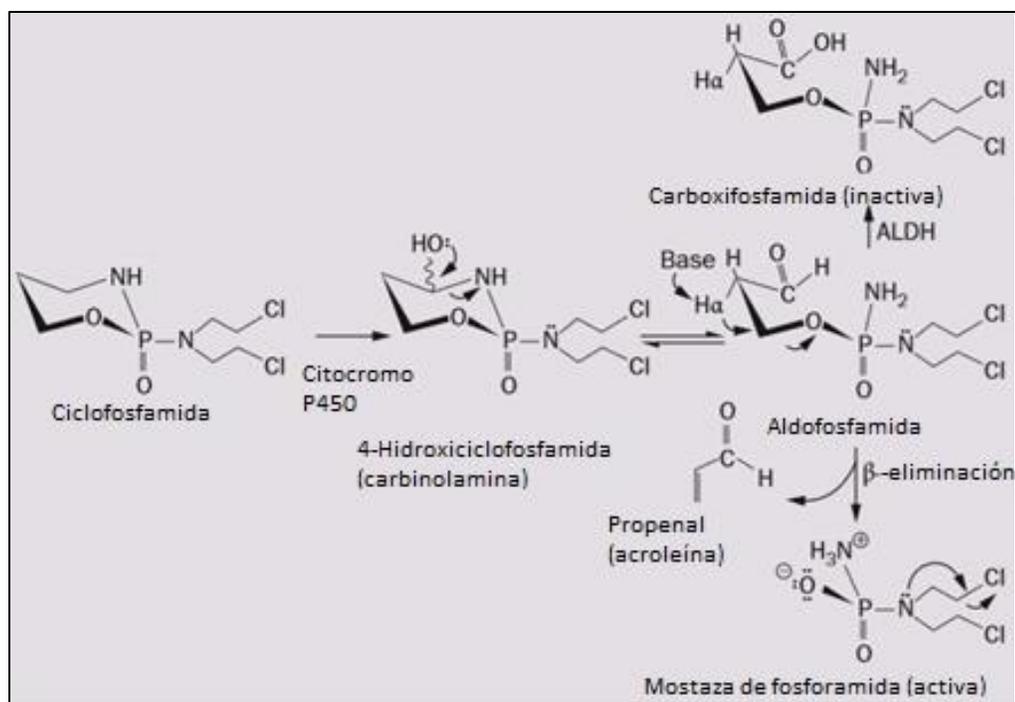


Figura 3. Ruta del metabolismo de la ciclofosfamida. (Imagen adaptada de³¹)

La hidroxilación en el anillo de oxazafosforina (ciclofosfamida) que genera la 4-hidroxiciclofosfamida es catalizada por las isoenzimas CYP2B6, 2C9 y 3A4 (con 2A6, 2C8 y 2C19 haciendo contribuciones menos importantes). Compitiendo con la 4 C-hidroxilación de la ciclofosfamida se lleva a cabo una ruta oxidativa en menor medida (aproximadamente 10%) que desencadena la *N*-descloroetilación y la formación del compuesto neurotóxico cloroacetaldehído. El CYP3A4 es el principal responsable de la oxidación indeseable en una de las cadenas, con una menor participación del CYP2B6.

Posteriormente, la 4-hidroxiciclofosfamida se convierte rápidamente en su tautómero, aldofosfamida y lo más frecuente es que ambos metabolitos se difundan pasivamente hacia afuera de la célula hepática, circulando, y después entrando pasivamente a otra célula. La aldofosfamida se somete a una reacción de eliminación espontánea (no enzimática) para producir la mostaza de fosforamida y acroleína (asociado a cistitis hemorrágica, uno de los mayores efectos tóxicos de la ciclofosfamida)^{32, 33}.

La mostaza de fosforamida, es generalmente a la que se le atribuye significancia clínica como agente intercalante en el DNA. En consecuencia, la generación

intracelular de este compuesto a partir de aldofosfamida es importante para un efecto terapéutico^{32,33}. La acción citotóxica de la mostaza de fosforamida está estrechamente relacionada con la reactividad de los grupos 2-cloroetilo unidos al átomo de nitrógeno central. En condiciones fisiológicas, las mostazas nitrogenadas se someten a ciclaciones intramoleculares mediante la eliminación del cloruro para formar un catión de aziridinio (etileniminio) cíclico. Este catión altamente inestable es atacado fácilmente en uno de los átomos de carbono del anillo de tres miembros de la aziridina por varios nucleófilos, como los residuos de guanina del DNA. Esta reacción libera el nitrógeno del agente alquilante y lo hace disponible para reaccionar con la segunda cadena lateral del 2-cloroetilo, que forma un segundo enlace covalente con otro nucleófilo, lo que interfiere con la replicación del DNA al formar enlaces intra e inter- cadena en el DNA³⁴.

Una ruta de desintoxicación importante es la oxidación de aldofosfamida a la carboxifosfamida inactiva mediada por la enzima aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) y, en mucho menor medida, por ALDH3A1 y ALDH5A1. Los múltiples metabolitos de ciclofosfamida pueden reaccionar también con el glutatión (GSH), que conlleva a la formación de varios conjugados en diferentes sitios a lo largo de la ruta. Algunas de estas reacciones con GSH pueden ser reversibles, mientras que otras son irreversibles; estas últimas están asociadas con vías de desintoxicación.

Se han observado diferencias significativas en el grado de formación de metabolitos entre pacientes y estas diferencias entre individuos pueden deberse a polimorfismos en las enzimas CYP. Particularmente, los polimorfismos en CYP3A4 y 3A5 han correlacionado con la respuesta o la supervivencia en los pacientes tratados con ciclofosfamida^{32,33}.

5.4 Quimiorresistencia

La resistencia farmacológica es un problema mayor que limita la efectividad de las quimioterapias utilizadas para tratar el cáncer. Existen dos tipos de quimiorresistencia, una en donde los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes a la quimioterapia, antes de haber recibido un tratamiento, y otra en

donde la resistencia es adquirida durante el tratamiento por tumores que fueron sensibles al inicio de la quimioterapia. Estos últimos tipos de tumores no solo se vuelven resistentes a los fármacos originalmente utilizados para tratarlos, sino que también pueden desarrollar resistencia cruzada con otros medicamentos con diferentes mecanismos de acción. Se cree que tanto la resistencia intrínseca como la adquirida son responsables de más del 90% de las fallas terapéuticas en pacientes con cáncer metastásico. Así mismo, las células de tumores resistentes metastásicos también pueden ver reducida la efectividad de la quimioterapia adyuvante³⁵.

Hay varios factores que afectan la sensibilidad al fármaco. Éstos incluyen mecanismos como aquéllos que limitan la cantidad de fármaco que llega al tumor y aquellos que afectan el microambiente de éste. La resistencia de la célula cancerosa puede ocurrir a diferentes niveles, incluyendo el incremento del eflujo o el decremento del influjo del fármaco, la inactivación del medicamento, alteraciones en el blanco terapéutico, procesamiento de daño inducido por el antineoplásico y evasión de la apoptosis³⁵.

5.4.1 Cambios en el eflujo del fármaco en la célula.

El principal proceso por el que las células de cáncer exhiben sensibilidad reducida a una variedad de fármacos no relacionados es la resistencia a multifármacos. Este fenómeno está mediado por proteínas transportadoras de membrana. De éstas, la familia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC) es considerado el grupo más importante de proteínas transmembranales que dirigen el transporte de varios fármacos, no relacionadas químicamente, a través de la membrana plasmática³⁶.

La proteína 1 de resistencia a multifármacos (MDR1, glicoproteína-P [PGP], ABCB1), la proteína 1 asociada a MDR (MRP1, ABCC1) y la proteína de resistencia a cáncer de mama (BCRP, ABCG2) han sido las más investigadas en tumores. Las tres proteínas, y otros miembros de la familia, son capaces de eliminar lípidos y además varias clases de fármacos quimioterapéuticos hidrofóbicos³⁶.

La resistencia resulta del incremento del eflujo del fármaco, es decir del transporte del antineoplásico desde dentro de la célula hacia afuera de ella, lo que desencadena una disminución de la concentración del medicamento intracelularmente, y por lo tanto de sus efectos³⁷.

5.4.1.1 *Transportadores de unión a ATP (ABC)*

Los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) son una superfamilia de proteínas de membrana que comprenden 48 miembros divididos en 7 diferentes familias (de la A hasta la G) basados en las similitudes de su secuencia. Estas proteínas están altamente conservadas en la evolución y hay una alta similitud de secuencia entre los miembros, especialmente aquéllos que pertenecen a una misma familia. La proteína funcional típicamente contiene dos dominios de unión a nucleótido (NBDs) y dos dominios transmembranales codificado por un polipéptido sencillo. Los transportadores ABC también pueden estar multicompuestos por unidades en donde cada dominio o la mitad de la molécula está codificado por genes diferentes³⁸.

Para la mayoría de los transportadores ABC, la unión y subsecuente hidrólisis del ATP en sus dominios de unión a nucleótidos, es requerida para proveer energía al movimiento de sus sustratos a través de la membrana. Dos motivos de secuencia ubicados a 100–200 aminoácidos separados en cada NBD, designados Walker A y Walker B, se conservan entre todos los miembros de la superfamilia ABC de transportadores, así como muchas otras proteínas de unión a ATP. El residuo de lisina en el motivo Walker A está involucrado en la unión del β -fosfato del ATP mientras que el residuo de ácido aspártico en el motivo Walker B interactúa con Mg^{2+} . Además, exclusivo de las proteínas ABC, hay una tercera secuencia de aminoácidos altamente conservada (ALSGGQ) ubicado entre los motivos Walker A y B, referido como el motivo de la signatura ABC (o motivo C). La función precisa de esta secuencia aún no se ha determinado, aunque ha sido directamente asociado con el reconocimiento, la unión y la hidrólisis del ATP ³⁹.

Los transportadores ABC pueden tener una gran variedad de roles celulares: regulan la permeabilidad local, siendo expresados en la barrera hematoencefálica, en el líquido cefalorraquídeo de la sangre, en la barrera hemato- testicular y en la placenta. En el hígado, el tracto gastrointestinal y el riñón, los transportadores ABC excretan toxinas protegiendo al organismo. También juegan un papel activo en el sistema inmune transportando péptidos desde el retículo endoplásmico que están identificados como moléculas HLA de clase I. Así mismo, en el ámbito fisiológico celular, transportan lípidos y regulan la homeostásis³⁸.

5.4.1.1.1 *ABCB1 (MDR1/glicoproteína-P)*

El gen *MDR1* humano se localiza en la porción proximal del brazo largo del cromosoma 7, específicamente en la banda 7q21-21.1. En las células humanas hay un segundo gen *MDR*, denominado *MDR3*⁴⁰.

La glicoproteína-P humana es el producto del gen *MDR1* o *ABCB1*³⁸. Este transportador ABC fue el primero en ser descubierto en células de ovario de Hámster chino seleccionadas para ser resistentes a colchicina. Cada mitad de la proteína de 170 kDa contiene un dominio hidrofóbico aminoterminal y un dominio hidrofílico carboxiterminal. Cada dominio hidrofóbico puede formar 6 regiones transmembrana, y cada dominio hidrofílico contiene 2 regiones que, juntas, forman un lugar para la unión de nucleótidos trifosfato (ATP). La porción carboxiterminal de la glicoproteína-P se encuentra en el lado citoplasmático de la membrana plasmática, al igual que los lugares de unión del ATP. Los 12 dominios transmembrana constituyen 6 pares, cada uno unido por un dominio extracelular de pequeña longitud. Además, existen lugares que pueden ser glucosilados en la primera región extracelular de la porción N-terminal⁴⁰ (Figura 4).

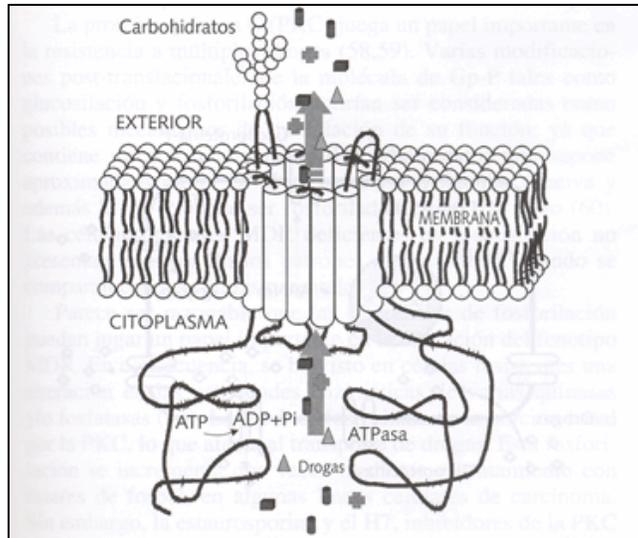


Figura 4. Estructura tridimensional de la glicoproteína-P. (Imagen adaptada de ⁴¹)

La glicoproteína-P actúa como bomba de eflujo dependiente de ATP. Se sobreexpresa en varios tumores humanos antes del inicio de cualquier quimioterapia y, por lo tanto, contribuye a la resistencia intrínseca. La expresión de *MDR1* se incrementa durante la quimioterapia en varios tumores humanos y contribuye en la resistencia contra compuestos que contienen platino, inhibidores de la topoisomerasa II, sustancias tóxicas de microtubulina y varios inhibidores tirosin-quinasa³⁶. Así mismo, confiere altos niveles de resistencia a fármacos anfipáticos de productos naturales y cuyas moléculas son voluminosas, tales como paclitaxel, alcaloides de la vinca, antraciclinas, camptotecinas y epipodofilotoxinas³⁹.

5.4.1.1.2 ABCC (MRP)

La proteína 1 asociada a MDR (ABCC1/ MRP1) es una proteína de 190 kDa. Su aislamiento facilitó el descubrimiento de otros ocho genes dentro de la misma subfamilia ABC, de las cuales al menos cuatro: MRP2 (codificado por *ABCC2*), MRP3 (codificado por *ABCC3*), MRP4 (codificado por *ABCC4*) y MRP5 (codificado por *ABCC5*) están involucrados en mediar la resistencia a fármacos. Sin embargo,

la relevancia clínica de MRP2 a MRP5 en la resistencia a fármacos antineoplásicos es incierta³⁹.

MRP1 y MRP2 tienen una estructura atípica respecto a la estructura más frecuente en los transportadores ABC eucarióticos. Éstos están compuestos de cinco dominios con un MSD (dominio que se extiende sobre la membrana) NH₂-proximal extra que tienen cinco segmentos transmembranales y uno extra citosólico NH₂-terminal, seguidos de los cuatro dominios más típicos en el núcleo de la estructura de los transportadores ABC (Figura 5)³⁹.

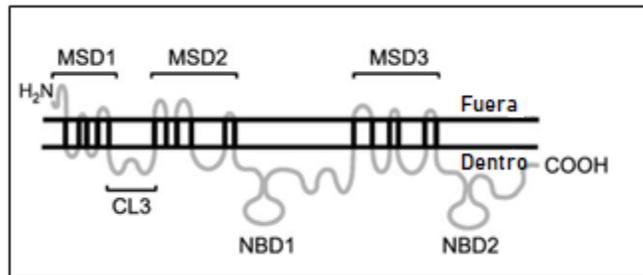


Figura 5. Estructura secundaria predicha para MRP1 y MRP2. (Imagen adaptada de³⁹).

MRP1 es responsable del transporte de una notable variedad de medicamentos hidrófobos, aniones orgánicos, incluyendo fármacos conjugados con GSH, glucuronato o sulfato. También media el co-transporte de aniones anfifílicos no conjugados, junto con el GSH libre.

La mayor función fisiológica de *ABCC1* es presumiblemente el transporte de Leucotrieno C₄⁴². El eflujo de xenobióticos por MRP1 y MRP2 como vincristina y daunorubicina es a través de un mecanismo de co-transporte con la reducción de GSH³⁹.

Una diferencia importante entre MRP1 y MRP2 con respecto a la resistencia a los medicamentos contra el cáncer es que la sobreexpresión de MRP2, pero no de MRP1, es la asociada con la resistencia al cisplatino. MRP1 y MRP2 también transportan metabolitos de agentes de alquilación que incluyen clorambucilo y ciclofosfamida. Además, se ha demostrado que MRP1 efluye la flutamida

antiandrógeno, un medicamento importante para el tratamiento hormonal del cáncer de próstata³⁹.

5.4.2 Cambios en el influjo del fármaco en la célula.

El mecanismo por el cual muchos quimioterapéuticos son captados por las células, disminuyendo el influjo del fármaco al interior celular, es desconocido. De cualquier forma, se ha establecido que los inhibidores de la vía del folato (medicamentos anti-folato) como el inhibidor dihidrofolato reductasa (DHFR), metotrexato (MTX) y el inhibidor de la timidato sintasa (TS) tomudex ingresan a la célula predominantemente a través del acarreador de folato reducido (RFC). La disminución de la expresión del RFC, las mutaciones de inactivación del RFC y la disminución de la captación celular de MTX por el RFC son mecanismos documentados de resistencia a MTX³⁵.

5.4.3 Inactivación del fármaco

La aldehído deshidrogenasa (ALDH), glutatión-S-transferasa (GST), DT-diaforasa, dihidropirimidin deshidrogenasa (DPD), citocromo P450 y uridinadifosfato glucuroniltransferasa (UGT) son un grupo diverso de enzimas, que son responsables del metabolismo de una amplia gama de xenobióticos químicos, como carcinógenos, pesticidas, contaminantes, alimentos tóxicos, así como diversas biomoléculas endógenas; por ejemplo, prostaglandinas, esteroides y ácidos biliares. Estas enzimas también son responsables de la biotransformación de muchos fármacos antineoplásicos conocidos en sus correspondientes metabolitos inactivos contribuyendo a la ineficacia o resistencia a los medicamentos⁴³.

5.4.3.1 Citocromo P450

Los citocromos P450 son oxidorreductasas responsables del 75-80% del metabolismo de fase I y del 65-70% del aclaramiento de los fármacos clínicamente

usados⁴³⁻⁴⁴. Hay 57 genes CYP activos en el genoma humano, que están divididos en 18 familias⁴⁴. En términos generales, se pueden clasificar en tres familias principales, CYP1, CYP2 y CYP3, que están ampliamente involucradas en el metabolismo de medicamentos, xenobióticos y carcinógenos⁴³. Las demás familias, están usualmente involucradas en el metabolismo de sustancias endógenas⁴⁴. Aunque estas enzimas se requieren para el metabolismo de medicamentos, su sobreexpresión podría metabolizar rápidamente las moléculas del fármaco antes de llegar a sus blancos y conferir ineficacia y resistencia a los medicamentos⁴³.

El mecanismo general de oxidación de sustratos (fármacos) a través de P450 se describe en la Figura 6. Todos los citocromos contienen un grupo hemo en su sitio activo y este grupo está compuesto por un hierro central (Fe) y un grupo prostético, que es un anillo de protoporfirina. El centro hemo está coordinado con el tiolato del residuo de cisteína conservado del sitio activo y una molécula de agua. La molécula de sustrato inicialmente facilita el desplazamiento de Fe^{3+} coordinando la molécula de agua y hace su espacio para unirse al sitio activo. A continuación, la transferencia de un electrón facilita que la enzima NADPH P450 reductasa cause la reducción del ión férrico (Fe^{3+}) a ión ferroso (Fe^{2+}). Posteriormente, una molécula de oxígeno se une al centro reducido de Fe^{2+} y genera un complejo de superóxido, que es hemo (Fe^{3+}) -Cys. A partir de entonces, la NADPH P450 reductasa facilita la transferencia de electrones al Fe^{3+} de este complejo de superóxido y genera especies reactivas de corta duración como peroxo-hierro, hidroperoxo-hierro y oxo-hierro. Finalmente, estas especies reactivas, de forma gradual, facilitan la hidroxilación de las moléculas del sustrato y se libera el producto hidroxilado⁴³.

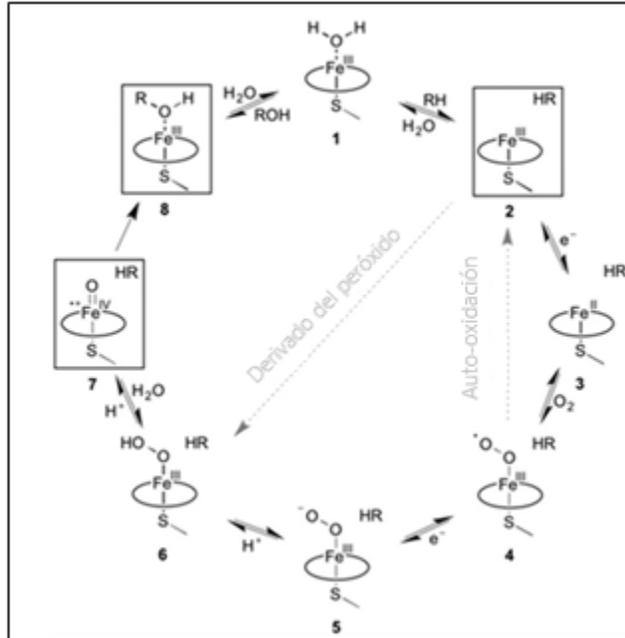


Figura 6. Ciclo catalítico del CYP. El complejo de Fe³⁺(2), el compuesto I (7) y el producto del sustrato hidroxilado (8), están enmarcados. (Imagen adaptada de⁴⁵).

La importancia del metabolismo de fármacos antineoplásicos mediado por P450 fue destacado por Yao et al. en el 2000, quién mostró que el CYP3A puede jugar un papel en la resistencia a alcaloides de la vinca y por Dhani et al. en 2003, quién relacionó al CYP3A4/5 en la resistencia de osteosarcomas a la quimioterapia⁴⁵.

Curiosamente, uno de los CYP, CYP1B1 es expresado exclusivamente en varios tipos de células cancerosas, como en mama, pulmón, colon, esófago, piel, testículos, ganglios linfáticos y tumor cerebral y se ha relacionado con la resistencia de varios medicamentos contra el cáncer como el docetaxel, el paclitaxel, el cisplatino, el tamoxifeno y la flutamida⁴³.

Hay otros CYP para los que se ha demostrado que sus altos niveles de expresión en cáncer tienen una importante relación no solo con la activación de profármacos, sino también con la quimiorresistencia en células cancerosas madre (CSC por sus siglas en inglés). Por ejemplo, las CSC de colon han aumentado la expresión de CYP3A. Por otra parte, se le atribuyó al CYP2C9 inducido por la hipoxia, la resistencia a doxorubicina en células cancerosas madre de hígado⁴⁵.

5.4.3.2 Otros mecanismos de inactivación del fármaco.

- La superfamilia ALDH humana está compuesta por 19 miembros, que actúan como oxidorreductasas y catalizan la oxidación dependiente de NAD(P)⁺ de aldehídos endógenos / exógenos en ácido carboxílico y ésteres de coenzima A(CoA). Las ALDH se encuentran en el citosol, núcleo, mitocondrias y retículo endoplásmico; sin embargo, cada isoforma tiene una expresión celular específica. Entre las isoformas de ALDH, ALDH1A1 y ALDH3A1 han sido reportadas como causantes de resistencia contra la clase de fármacos antineoplásicos de tipo "mostaza nitrogenada", como ciclofosfamida, mafosfamida e ifosfamida. La sobreexpresión de estas ALDH en varias líneas celulares cancerosas, aumentan la rapidez de metabolismo y el aclaramiento plasmático de la ciclofosfamida resultando en la pobre respuesta de la quimioterapia con ciclofosfamida o resistencia al citostático⁴³.
- La GST pertenece a una familia de transferasas/ oxidorreductasas que se clasifican en términos generales en tres categorías: citosólica, mitocondrial y microsómica. En general, la GST catalizan la conjugación de varios xenobióticos electrofílicos (endógeno y exógeno) con γ -glutamil-cisteinil-glicina (GSH), donde el grupo -SH de la GSH facilita el ataque nucleofílico al centro electrofílico presente en el sustrato, como xenobióticos⁴³.
Entre las isoformas, GST- π y GST- μ 1 son de suma importancia debido a la correlación directa de su abundancia de expresión con la resistencia a cisplatino en varios tipos de cáncer humano, como mama, colon, riñón, pulmón y ovario⁴³.
- La NQO1-diaforasa es una flavoenzima perteneciente a una familia de las oxidorreductasas y se expresa comúnmente en el citosol. En las células tumorales, algunos análogos de quinona como la mitomicina-C, la β -lapachona y la 17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina son desactivados por esta enzima⁴³.
- La DPD es una oxidorreductasa principalmente expresada en el hígado y varios tejidos neoplásicos como carcinoma de células humanas escamosas de

esófago, cabeza y cuello. Cataliza el primer paso de la degradación de la pirimidina, es decir, la reducción de la timina dependiente de NADPH y restos de uracilo de moléculas de fármacos. Algunas de las moléculas de medicamentos contra el cáncer que contienen residuos de pirimidina incluyen al 5-fluorouracilo (5-FU), el tegafur y la capecitabina. Por lo tanto, se ha indicado una fuerte correlación entre la sobreexpresión de DPD en células cancerosas y la resistencia de la quimioterapia con 5-FU⁴³.

- Las UGT catalizan la transferencia de un residuo glucuronilo a sustratos endógenos, como la bilirrubina, los ácidos biliares, los esteroides y las sustancias exógenas. Alrededor del 15-20% de los principales medicamentos recetados en EE. UU. se someten a aclaramiento a través del mecanismo de glucuronidación. Los conjugados de R-glucurónido son de naturaleza altamente hidrófila en comparación con la molécula original del fármaco; por lo tanto, se excretan fácilmente a través del riñón y el sistema biliar⁴¹. El irinotecán es el compuesto más relacionado con resistencia a través de este mecanismo⁴³.

5.4.4 Otros mecanismos de resistencia.

5.4.4.1 Cambios en el blanco terapéutico

A menudo, los blancos farmacológicos de los agentes antineoplásicos son enzimas, DNA o proteínas involucradas en la replicación celular. Cuando hay alteraciones, éstas pueden ser cuantitativas (por ejemplo, nivel de expresión) o cualitativas (por ejemplo, mutación). En el caso de las antimetabolitos que interfieren en varios pasos del metabolismo de los ácidos nucleicos, a través de la inhibición de enzimas clave (timidilato sintasa, dihidrofolato reductasa, ribonucleótido reductasa, DNA polimerasa), un mayor contenido del enzima blanco puede dar lugar a resistencia a los medicamentos⁴⁶. Ejemplos de este mecanismo son la resistencia al 5-FU debido al aumento del nivel de timidilato sintasa.

Por otro lado, la regulación a la baja de la topoisomerasa de DNA disminuye la sensibilidad a agentes antitumorales como las antraciclinas y las camptotecinas; y alteraciones en los niveles de tubulina confieren resistencia al taxol⁴⁶.

5.4.4.2 Inhibición de la respuesta de daño al DNA

Existen mecanismos para eliminar bases dañadas, denominados reparación de escisión de nucleótidos (NER), reparación de escisión de base (BER) y reparación de discordancia (MMR). En los tres, se reconoce el daño, se empalma la lesión y se insertan nuevas bases para llenar el vacío, seguido de la ligación de las cadenas reparadas. La regulación a la alta de los mecanismos de reparación del DNA en células tumorales se ha asociado con la resistencia a los fármacos genotóxicos⁴⁶.

La reparación por escisión de nucleótidos (NER) es la vía principal para la eliminación del aducto de platino-DNA y la reparación del daño en el DNA inducido por fármacos de platino³⁵. Por su lado, la vía BER es esencial para la reparación del DNA dañado inducido por agentes oxidantes y alquilantes. Finalmente, los tumores con defectos en el sistema MMR exhiben una resistencia marcada a los agentes alquilantes y una variedad de agentes anticancerígenos que modifican el DNA para crear sustratos para el sistema MMR⁴⁶.

5.4.4.3 Evasión de la apoptosis

Se han detectado dos cascadas de caspasas intracelulares que provocan apoptosis: la ruta intrínseca regulada por las proteínas Bcl-2 y la ruta extrínseca regulada por los miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF)³³.

Una variedad de agentes quimioterapéuticos induce alguna de las vías de muerte celular programada en células susceptibles. Sin embargo, varios defectos desactivan la apoptosis y pueden producir resistencia a múltiples fármacos⁴⁶.

La proteína supresora de tumores p53 se requiere tanto para inducir como para reprimir las vías de apoptosis. Por lo tanto, las mutaciones de pérdida de función en

el gen p53 o en la vía p53 pueden producir resistencia a los agentes que dañan el DNA. Así mismo, las mutaciones o la expresión alterada de proteínas relacionadas con Bcl-2 han alterado drásticamente la sensibilidad a los medicamentos en modelos experimentales y aunque la contribución de eventos post-mitocondriales de la respuesta celular está menos definida, los defectos a este nivel también pueden promover la resistencia, por ejemplo, la inactivación epigenética del factor -1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1, por sus siglas en inglés)⁴⁶.

5.4.4.4 Detención del ciclo celular

Las células responden al daño del DNA activando vías de control que bloquean la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y detienen la progresión del ciclo celular. Estos puntos de control se presentan en la fase G1, S, G2 y en la metafase, en donde se asegura la integridad del DNA o de elementos clave del proceso, de lo contrario se detiene el ciclo⁴⁶.

La resistencia a los medicamentos mediada por el ciclo celular se describe mejor como una insensibilidad relativa a un agente de fase específico. Este fenómeno es relevante en la quimioterapia combinada. Ejemplos de fármacos susceptibles a este mecanismo son las camptotecinas que se consideran específicas de la fase S, lo que implica que las células cancerosas que no replican activamente el DNA podrían no verse afectadas por el medicamento. También el paclitaxel es predominantemente un fármaco específico de la fase M⁴⁶.

5.4.4.5 Señales pro-supervivencia

La sobreexpresión y las mutaciones oncogénicas de muchas proteínas tirosin cinasa (PTK) se han descrito en cánceres humanos. Algunas de las PTK mejor caracterizadas son la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), que comprende EGFR (ErbB1, Her1), Her2 (ErbB2, Neu), Her3 (ErbB3) y Her4 (ErbB4). La unión de factores, como el de crecimiento epidérmico (EGF), el de crecimiento transformante α (TGF- α) y las

heregulinas da como resultado homo y heterodimerización de EGFR, Her3 y Her4, siendo el compañero de unión preferido Her2. La dimerización del receptor crea sitios de acoplamiento para transductores de señal antiapoptóticas que incluyen a la ruta fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / Akt y la ruta STAT³⁵.

Tanto EGFR como Her2 han sido fuertemente implicados en la progresión tumoral, donde la sobreexpresión del receptor se asocia con enfermedad avanzada y mal pronóstico, pues se ha demostrado que la sobreexpresión *in vitro* de EGFR y Her2 aumenta la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos³⁵.

6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia de las células tumorales de pacientes pediátricos con rhabdomyosarcoma a fármacos antineoplásicos genera reincidencia o progreso a estadios más avanzados de la enfermedad. El determinar *in vitro* la asociación de la expresión de proteínas y transportadores relacionadas con el fenómeno de quimiorresistencia será de utilidad para predecir qué tipo(s) de mecanismo(s) tienen un papel en esta neoplasia, cuál será la respuesta más probable al tratamiento de pacientes pediátricos con este tipo de cáncer; así como para proponer una estrategia que contrarreste este fenómeno.

Las ventajas de los modelos *in vitro* son que se consideran menos costosos y útiles para el cribado de alto rendimiento de fármacos sin necesidad de utilizar animales. Además, de acuerdo con estudios preclínicos pediátricos, en donde se ha investigado la autenticidad de líneas celulares de cáncer pediátrico a través de comparar los perfiles de expresión y las alteraciones del número de copias de gen a las muestras clínicas, se ha demostrado que estos modelos preclínicos pueden recapitular características genéticas y moleculares de los cánceres pediátricos humanos³. Aunado a las cuestiones éticas y legales para la obtención de muestras humanas para el análisis experimental, el uso de las líneas celulares se convierte en una gran alternativa para el estudio de los mecanismos relacionados con el desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos.

7 HIPÓTESIS

Las células tumorales de rhabdomyosarcoma alveolar expuestas a ciclofosfamida presentarán mayores niveles de expresión de miembros del citocromo P450 y de transportadores de tipo ABC como mecanismos de resistencia adquirida al fármaco antineoplásico.

8 OBJETIVO GENERAL

Comparar los niveles de expresión de los citocromos P450 y transportadores ABC en células de rhabdomyosarcoma alveolar sin y con exposición a ciclofosfamida en diferentes periodos de tiempo.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Línea celular

Se utilizó la línea celular SJCRH30 [RC13, RMS13] (ATCC® CRL2061™), la cual proviene de un sitio metastásico de médula ósea de un hombre de diecisiete años diagnosticado con rhabdomyosarcoma alveolar.

Esta línea celular adherente fue cultivada en monocapa empleando el medio XGI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina) a partir del pase 0.

9.2 Estrategia experimental

Primero, se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de ciclofosfamida en la línea celular SJCRH30. A continuación, se trató a las células de RMS alveolar con dicha concentración y se obtuvieron muestras a los días 3, 7, 14, 21 y 28. Posteriormente, 30 µL de las suspensiones celulares de cada muestra, así como las de sus controles sin tratamiento, se utilizaron para llevar a cabo ensayos de viabilidad celular. La suspensión restante se empleó para la obtención y purificación del RNA y las proteínas totales. Finalmente, por medio de RT-PCR, se evaluó el nivel de expresión de los genes *CYP2B6*, *2C9*, *3A4/5* y *ABCC2*; así como el nivel de expresión proteica de la glicoproteína-P y el CYP3A5, a través de ELISA y Western Blot, respectivamente. Lo descrito anteriormente se esquematiza a continuación en la Figura 7.

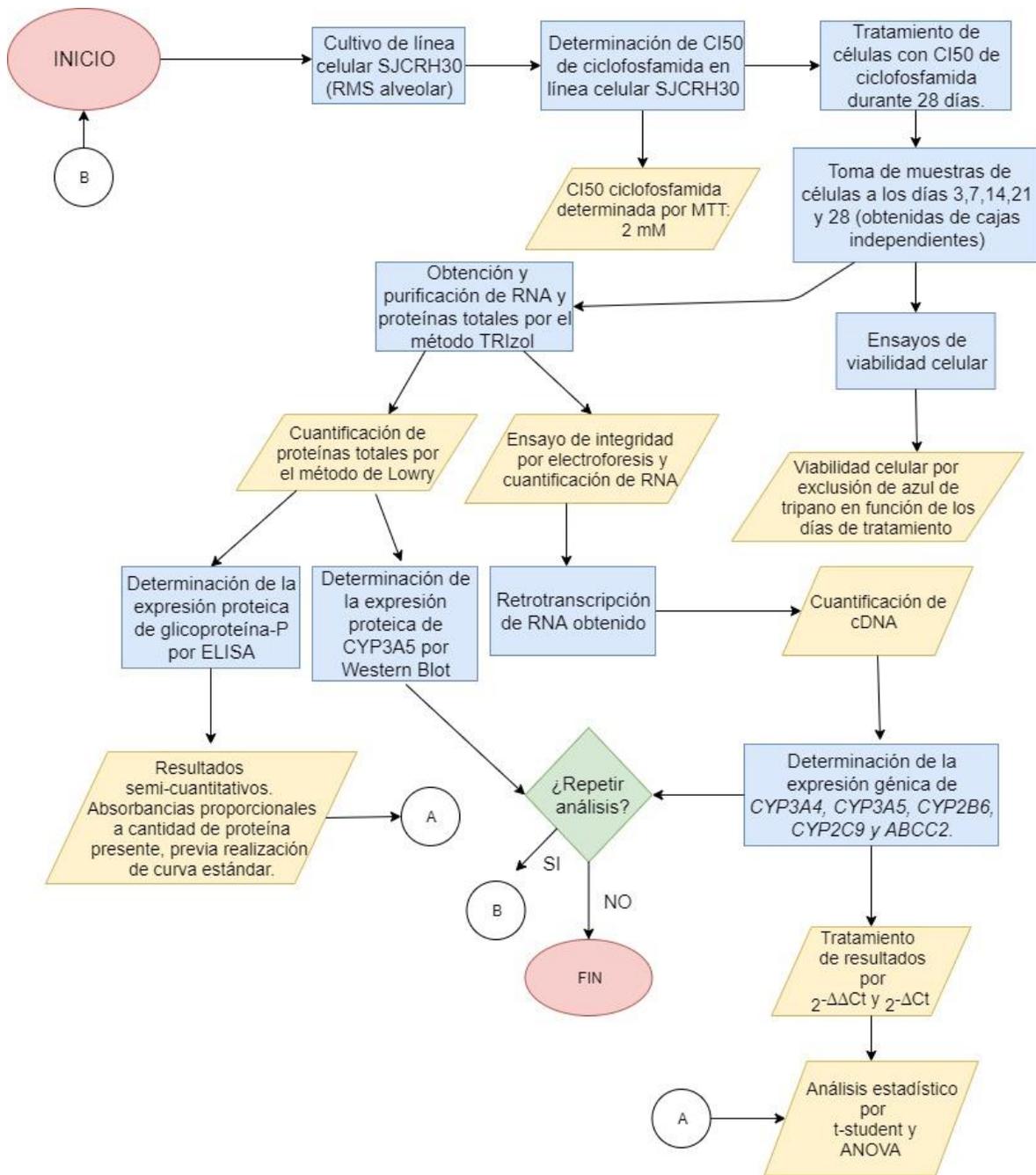


Figura 7. Estrategia experimental.

9.3 Cultivo celular

El cultivo de las células SJCRH30 se realizó en botellones para cultivo celular de 25 cm² con medio completo (medio XGI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL). Los botellones se incubaron a 37°C y CO₂ 5%, con cambio de medio de cultivo dos veces por semana.

Las células fueron observadas en un microscopio invertido y se realizaron resiembras una vez que se observó un 80% de confluencia celular (nivel de ocupación de la superficie de crecimiento). Para las resiembras se empleó una solución de tripsina al 0.25% con EDTA 1 mM con el fin de despegar a las células de la superficie de crecimiento. A su vez, la tripsina fue inactivada con medio completo y la suspensión celular obtenida se colocó en un tubo estéril desechable. Cada resiembra se denominó como “pase” y se etiquetó con números arábigos sucesivos. Se realizaron 7 pases antes de comenzar cada repetición del experimento.

9.3.1 Conteo celular por exclusión de azul de tripano

Las células viables en suspensión fueron cuantificadas mediante el siguiente procedimiento: en una cámara de Neubauer se colocaron 10 µL de una mezcla que contenía la misma proporción de suspensión celular y solución estéril de azul de tripano al 0.4% (1:1). Posteriormente, con el objetivo 10X del microscopio, se contabilizaron las células viables que se encontraban en los cuadrantes marcados en las esquinas de dicha cámara (Figura 8), es decir, aquéllas que se observaban redondeadas, íntegras e incoloras.

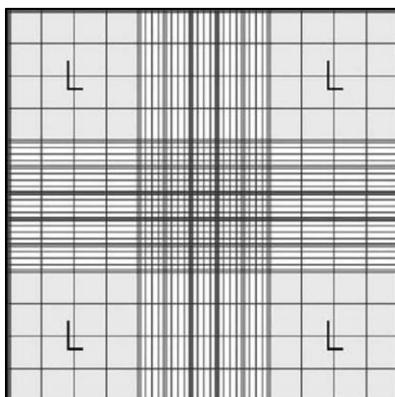


Figura 8. Representación de los cuadrantes de una cámara de Neubauer vista en microscopio. El conteo celular en este procedimiento se hizo en los cuadrantes marcados con una L. (Imagen adaptada de⁴⁷).

Para determinar el número de células por mL se empleó el siguiente razonamiento matemático.

$$\text{Conteo celular (CC)}_{total} = \left(\frac{\text{Suma del CC de los 4 cuadrantes}}{4} \right) \times 2 \times 10^4 \text{ cels/mL}$$

Donde 2 es el factor de dilución de la solución de células en solución de azul de tripano y 10^4 se refiere al inverso del volumen total que puede contener la cámara Neubauer.

9.4 Determinación de la concentración inhibitoria media de la ciclofosfamida

En placas de 24 pozos aptas para siembra celular, se adicionó por pozo, un volumen equivalente a 60,000 células del pase 9 en un volumen final de 500 μ L de medio completo y se incubaron a 37°C y CO₂ 5%. Una vez alcanzada una confluencia celular mayor al 80%, se retiró el medio y se agregaron, por triplicado, concentraciones ascendentes de ciclofosfamida (0.5-7.5 mM) disueltas en medio completo y esterilizadas por filtración. Como control negativo (0% de viabilidad

celular), se agregó Tritón X-100 al 10% y como control de 100% de viabilidad se empleó solo el medio completo. Las placas se incubaron por 72 h en las condiciones ya mencionadas.

Una vez concluida la incubación, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para ello se retiró el medio de las placas, se adicionó MTT estéril a una concentración de 0.25 mg/mL disuelto en medio completo y se incubó durante 3 h. Finalizado el periodo de incubación, se realizaron dos lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS). El formazán producido por las células viables fue disuelto en 1500 μ L de DMSO por pozo y se leyó la absorbancia a 570 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad respecto al control (células sin tratamiento) en función de la concentración de ciclofosfamida.

La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) fue reportada como la concentración de ciclofosfamida que produce una viabilidad celular de 50%.

9.5 Tratamiento con ciclofosfamida

Se sembraron 8 botellones para cultivo celular por repetición con 750,000 células del pase 9 en cada uno. Las células fueron tratadas con medio completo o con una solución estéril de ciclofosfamida (concentración igual a la CI_{50}), según corresponda, durante 7, 14, 21 y 28 días. Las muestras del día 3 no se procesaron en lo sucesivo, ya que no se encontró diferencia significativa en la viabilidad celular de éstas. Tanto a las células tratadas como a las células control se les realizó un recambio de medio o de tratamiento, según fuera el caso, dos veces por semana.

En cada periodo de tiempo, se realizó la recolección de muestras de las células tratadas con sus respectivos controles por tripsinización. En estas muestras se determinó el número de células viables por el método de exclusión con azul tripano y se realizó la obtención de RNA y proteínas totales.

9.6 Obtención de RNA y proteínas totales

Las muestras de células, tanto tratadas con ciclofosfamida como sus controles sin tratamiento, se procesaron de manera independiente por centrifugación a 3,300 xg y 4°C durante 5 min. El botón celular fue resuspendido en 500 µL del reactivo TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y se homogenizó a 4°C con un homogenizador mecánico dando de 2 a 3 pulsos de 2 min cada uno y dejando 1 min de descanso entre ellos.

Después se adicionaron 500 µL más de TRIzol, se mezcló por inversión y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez terminado este tiempo, se añadieron 200 µL de cloroformo, se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min a 4°C y se recuperó en un tubo nuevo la fase acuosa con ayuda de una micropipeta teniendo cuidado de no contaminarla con la fase orgánica.

Finalmente, se agregaron 500 µL de alcohol isopropílico tanto a la fase acuosa recuperada (RNA total) como a la fase orgánica (proteínas totales), y se les dejó precipitar a -20°C toda la noche.

9.6.1 Aislamiento y cuantificación del RNA total

Las fases acuosas obtenidas como se describió previamente se centrifugaron a 12000 xg a 4°C durante 25 min. Se desechó el sobrenadante por decantación y el precipitado se lavó con etanol al 75%, seguido de una centrifugación a 7500 xg durante 5 min a 4°C. Se desechó el etanol por decantación y se dejó secar el botón a temperatura ambiente para finalmente resuspender el RNA total en agua libre de RNAsas.

La cuantificación de RNA total (ng/µL) se llevó a cabo espectrofotométricamente en un NanoDrop empleando 2 µL de cada muestra. Las muestras de RNA con un índice de absorbancia 260/280 nm cercano a 2 fueron consideradas como puras⁴⁸.

La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Se evidenció la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S en los geles teñidos con GelRed® Nucleic Acid Stain y observados en un transiluminador UV (Anexo 13.1).

9.6.2 Obtención y cuantificación de proteínas totales.

El tubo conteniendo la fase orgánica obtenida con el reactivo TRIzol se centrifugó a 10600 xg, durante 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. En seguida se realizaron tres lavados con hidrocloreuro de guanidina 0.3 M en etanol al 95%. Entre cada lavado se incubó la muestra durante 20 min a temperatura ambiente y después de las incubaciones se realizó una centrifugación a 7,500 xg, durante 5 min a 4°C. Se hizo un último lavado con etanol absoluto, se incubó durante 20 min y posteriormente se centrifugó a 8320 xg durante 5 min a 4°C.

Al botón de proteínas totales se le adicionó una solución de urea 8 M y SDS 1% en amortiguador de Tris-HCl 1 M, pH 8 y se sonicó en frío con 5 ciclos de 15 s y 30 s de reposo, a una potencia de 80% para obtener el homogenado correspondiente. La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry (Anexo 13.2)⁴⁹.

9.7 Determinación de la expresión génica

9.7.1 Retrotranscripción.

Para la obtención de cDNA se utilizó el volumen correspondiente a 500 ng de RNA de cada muestra. Se utilizó el kit *TaqMan™ reverse transcription* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Para ello, se incubó en un termociclador el RNA disuelto en agua DEPC con 1.0 µL de oligo (dT)₁₆ (50 µM) en un volumen final de 5 µL a 65°C durante 5 min y a 4°C durante 2 min.

Posteriormente, se agregó la mezcla de reacción que contenía 2 µL de amortiguador de retrotranscripción 10x, 1.4 µL de solución de MgCl₂, 4 µL de mezcla

de dNTP (2.5 mM), 1.0 μ L de inhibidor de RNAsas (2 U/ μ L) y 1.0 μ L de MiltiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L). Inmediatamente después se posicionaron los tubos de reacción en el termociclador y se realizaron los siguientes tres ciclos: el primero a 37°C durante 30 min, el segundo a 95°C durante 5 min y el tercero a 4°C durante 30 min.

La cuantificación de cDNA (ng/ μ L) obtenido después de la retrotranscripción se llevó a cabo espectrofotométricamente en un NanoDrop, con 2 μ L de cada muestra de cDNA.

9.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

El análisis de la expresión del mRNA de *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCC2* en las muestras tratadas sin y con ciclofosfamida se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) empleando las sondas comerciales *TaqMan™* correspondientes. El gen ciclofilina A (PPIA) se eligió como gen de referencia debido a que no varió su expresión génica bajo las condiciones experimentales.

Se utilizaron placas de 48 pozos, cada pozo contenía un volumen final de mezcla de reacción de 15 μ L (200 ng de cDNA disuelto en agua DEPC y 8.25 μ L de una mezcla de Master Mix con sondas TaqMan® Applied Biosystems del gen de interés en una proporción 1:10). Posteriormente, la reacción se llevó a cabo en un termociclador ABI Prism 7000 para PCR en tiempo real, y se programaron 40 ciclos de amplificación, con las siguientes condiciones: 1) 2 min a 50°C, 2) 10 min a 95°C, 3) 55 min a 95°C y 4) 1 min a 60°C.

Los resultados se expresaron como C_T (ciclos de replicación para detectar gen blanco). Para determinar los niveles de expresión génica relativa y las veces de cambio con respecto al control se utilizaron los algoritmos matemáticos $2^{-\Delta C_t}$ y $2^{-\Delta\Delta C_t}$, respectivamente⁵⁰, donde

$$\Delta CT = \text{valor } CT \text{ gen blanco} - \text{valor } CT \text{ gen endógeno (PPIA)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ células tratadas} - \Delta CT \text{ células control}$$

9.8 Determinación de la expresión proteica

9.8.1 Ensayo Inmuno-Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

En una placa de 96 pozos para ELISA se colocaron volúmenes equivalentes a 10 µg de proteínas totales de cada muestra disuelta en amortiguador de carbonato de sodio 0.15 M, pH 7.6. La placa se cubrió con papel film y se incubó a 4°C toda la noche.

Al día siguiente, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y una vez con PBS. Posteriormente, se agregaron 200 µL/pozo de solución de bloqueo (albúmina al 1%) y se incubó la placa por 30 min a 37°C. Una vez terminada la incubación se realizaron nuevamente los lavados con PBS-Tween y PBS. A continuación, se añadieron 100 µL/pozo del anticuerpo primario correspondiente diluido 1:2000 y se incubó la placa 2 h a 37°C. Al terminar la incubación se realizaron nuevamente los lavados.

Las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:2500 durante 2 h a 37°C. Una vez terminados los lavados del anticuerpo secundario, se añadieron 100 µL/pozo de una solución de cromógeno/sustrato (dicloruro de o-fenilendiamina 1 mg/mL, ácido cítrico 50 mM, citrato de sodio 50 mM y peróxido de hidrógeno 0.012%) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se detuvo con 100 µL/pozo de H₂SO₄ 2 N. Finalmente, se leyó la absorbancia a 490 nm y la concentración de la glicoproteína-P presente en las muestras celulares tratadas sin y con ciclofosfamida se calculó por interpolación de las absorbancias de las muestras con respecto a las obtenidas de una curva de proteína recombinante humana.

9.8.2 Western blot

Se emplearon 20 µg de proteína total de las muestras para la separación de las proteínas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas resultantes se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm, previamente activadas con metanol, a 100 V por 1 hora, en agitación constante a 4°C.

Las membranas se bloquearon por 1 h con leche descremada al 5% y después se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente disuelto en leche al 0.5% (anti-CYP3A5 diluido 1:750 y anti-GAPDH diluido 1:5000). Al día siguiente se hicieron 3 lavados con TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.1%, pH 7.6) por 10 min.

A continuación, la membrana se expuso al anticuerpo secundario disuelto en leche al 0.5% (anticuerpo anti-conejo a una concentración 1:1500) por 1 h, y posteriormente se realizaron 3 lavados con TTBS por 10 min.

El revelado de las membranas se hizo con una solución 1:1 de luminol con peróxido de hidrógeno y las imágenes correspondientes se obtuvieron en el equipo ChemiDoc XRS.

9.9 Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron por triplicado y el análisis estadístico se realizó con el software Graphpad Prism 6 a través de pruebas “t” de Student para determinar diferencias significativas entre las medias del control y tratado de cada tiempo individual; y ANOVA con correcciones de Tukey para hacer comparaciones múltiples de los controles y los tratados, por separado, de todos los tiempos. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Concentración inhibitoria media de la ciclofosfamida

Con el propósito de evaluar la participación del citocromo P450 y los transportadores tipo ABC en la resistencia a fármacos antineoplásicos por las células tumorales de RMS, en el presente trabajo se utilizó como modelo experimental la línea celular SJCRH30. Esta línea celular fue establecida a partir de una muestra de médula ósea de un joven de 17 años diagnosticado con RMS alveolar. Este subtipo histológico de RMS se presenta con mayor frecuencia en población pediátrica y, además, es el que cursa con peor pronóstico *in vivo*¹².

De acuerdo con la Guía de referencia rápida para el Diagnóstico y Tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas en el paciente pediátrico, publicado por el Consejo de Salubridad del Gobierno Federal de México⁵¹, la ciclofosfamida es el agente quimioterapéutico de elección para el tratamiento de RMS en pacientes de todos los grupos de riesgo. En pacientes de bajo riesgo se usa este fármaco como parte del régimen VAC (vincristina, actinomicina, ciclofosfamida), así como también en pacientes de riesgo intermedio, donde se recomienda combinar VAC con VAI (vincristina, actinomicina e ifosfamida) o VIE (vincristina, ifosfamida y etopósido), combinado con cirugía y radioterapia. Por esta razón, se empleó este agente antineoplásico en los ensayos *in vitro*.

Primero, para determinar la resistencia intrínseca de las células de RMS a la ciclofosfamida, las células fueron tratadas durante 72 h con el agente antineoplásico y se evaluó su efecto sobre la viabilidad celular. Inicialmente se probaron concentraciones logarítmicas de ciclofosfamida de 1 μM a 100 mM y se detectó que las concentraciones a las que se observaba una viabilidad del 50% (CI_{50}) estaban entre 1 y 10 mM; por lo tanto, se decidió exponer a las células a concentraciones entre 0.5 y 7.5 mM de ciclofosfamida, con lo que se determinó una CI_{50} de 1.84 mM (Figura 9).

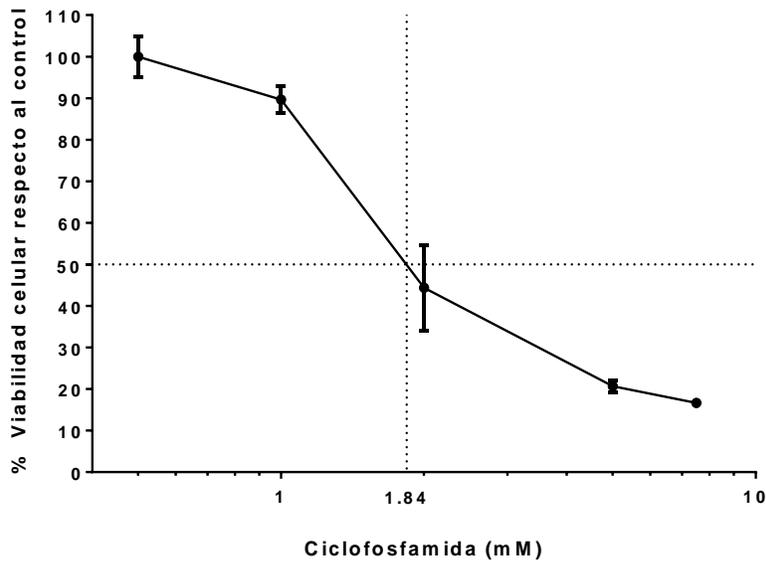


Figura 9. Efecto de la ciclofosfamida sobre la viabilidad de la línea celular SJCRH30. Concentraciones entre 0.5 mM y 7.5 mM, por un tiempo de 72 h. Las líneas punteadas muestran el valor de CI₅₀.

La CI₅₀ calculada es aproximadamente 250 veces mayor a la reportada por Heinicke Ulrike et. al. (2015)⁵² donde empleando concentraciones entre 0 y 8 μ M de ciclofosfamida para la línea celular Rh30, se observó un porcentaje máximo de muerte celular del 40%. El valor tan alto de CI₅₀ de la ciclofosfamida para inhibir el crecimiento de las células SJCRH30 calculado en este trabajo sugiere que la línea celular es intrínsecamente resistente al fármaco.

Existen discrepancias sobre las características de las líneas celulares de RMS alveolar Rh30, RH30 y SJCRH30 que podrían explicar las diferencias en la CI₅₀. Para algunos investigadores, se trata de la misma línea celular; mientras que otros reportan que las diferencias se encuentran en el tratamiento previo que recibió el paciente antes de obtener la muestra y establecer la línea celular⁵³. Cocker et.al. (2000)⁵⁴, indica que la línea celular Rh30 deriva del paciente sin tratamiento y que en el caso de la línea SJCRH30, si tuvo quimioterapia multiagente. Después de haber calculado la CI₅₀ de la ciclofosfamida, se sugiere que la línea celular que se

utilizó en este trabajo estuvo previamente tratada, ya que el valor de CI_{50} fue mucho mayor que el reportado en la literatura (entre 6 y 15 μM)^{52, 55}.

10.2 Efecto de la exposición temporal a ciclofosfamida

Para simular la forma en la que se cursa el tratamiento clínico de los pacientes con RMS donde una dosis constante de antineoplásico es administrada por diferentes periodos de tiempo (ciclos de tratamiento)⁵⁶ y para determinar si las células SJCRH30 adquieren resistencia a la ciclofosfamida, las células fueron tratadas durante 7, 14, 21 y 28 días con 2 mM del agente antineoplásico (CI_{50}) y se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control en los diferentes periodos de tiempo. Se observó una disminución en la viabilidad celular durante los primeros 14 días de tratamiento; sin embargo, después de 21 días de exposición al fármaco, las células muestran menor viabilidad celular en presencia de la ciclofosfamida (Figura 10).

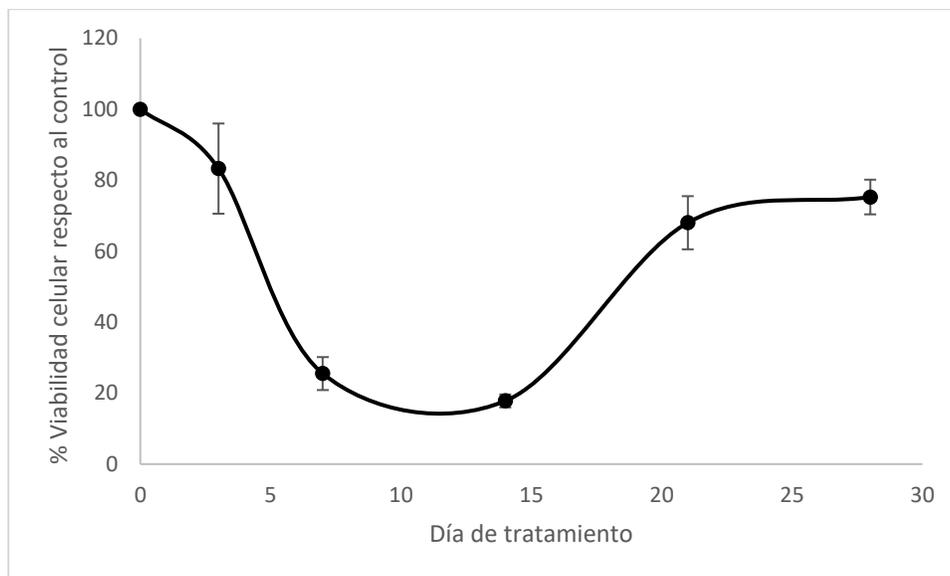


Figura 10. Efecto de la exposición temporal a ciclofosfamida sobre la viabilidad de la línea celular SJCRH30. [ciclofosfamida] = 2 mM. Cada muestra tuvo recambios cambios de medio con o sin ciclofosfamida, según fuera el caso, durante los días en incubación.

La disminución en la viabilidad celular observada sugiere que a partir del día 7 las células asimilaron el fármaco a sus metabolitos citotóxicos y en algún momento entre los días 15 a 21, las células sobrevivientes comenzaron a sobreexpresar mecanismos de resistencia y, por lo tanto, lograron sobrevivir al tratamiento. Sin embargo, el aumento de la viabilidad celular en las células tratadas en el día 21 también pudo haberse debido a que la disminución en el número de células permitiera una mejor adaptación a la superficie de cultivo permitiendo que las células viables pudieran crecer mejor.

A pesar de que este tipo de ensayos con concentraciones constantes de fármacos ha sido empleado para examinar la quimiorresistencia *in vitro* y los perfiles de expresión de posibles biomarcadores relacionados con el subtipo histológico de diferentes tipos de cáncer^{57,58,59}, la inducción de resistencia en otras líneas celulares se genera mediante incrementos paulatinos de la concentración de los antineoplásicos¹⁰. Esta metodología para generar quimiorresistencia en la línea celular SJCRH30 podría ser empleada en futuros ensayos.

10.3 Modulación de CYP y transportadores tipo ABC por exposición a ciclofosfamida

Como se mostró en la Figura 10, en cada tiempo de exposición hubo una disminución en la viabilidad celular debido al tratamiento con ciclofosfamida. Para determinar si las células que sobrevivieron pudieron haber sufrido cambios en la expresión de los CYP y transportadores tipo ABC que les permitieran resistir al agente antineoplásico, se evaluaron los niveles de expresión génica de *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCC2* mediante RT-PCR de los tiempos 7, 14, 21 y 28 días.

10.3.1 CYP2

CYP2B6 y CYP2C9 son participantes importantes en la activación de la ciclofosfamida, siendo el CYP2B6 la isoforma con mayor actividad 4-hidroxilasa^{29,60,61}. Sin embargo, en las muestras evaluadas y bajo las condiciones experimentales probadas, ambos genes no se expresaron en niveles detectables para ninguno de los tiempos evaluados. Después de 40 ciclos de amplificación, las señales de fluorescencia no sobrepasaron el umbral de detección (Figura 11).

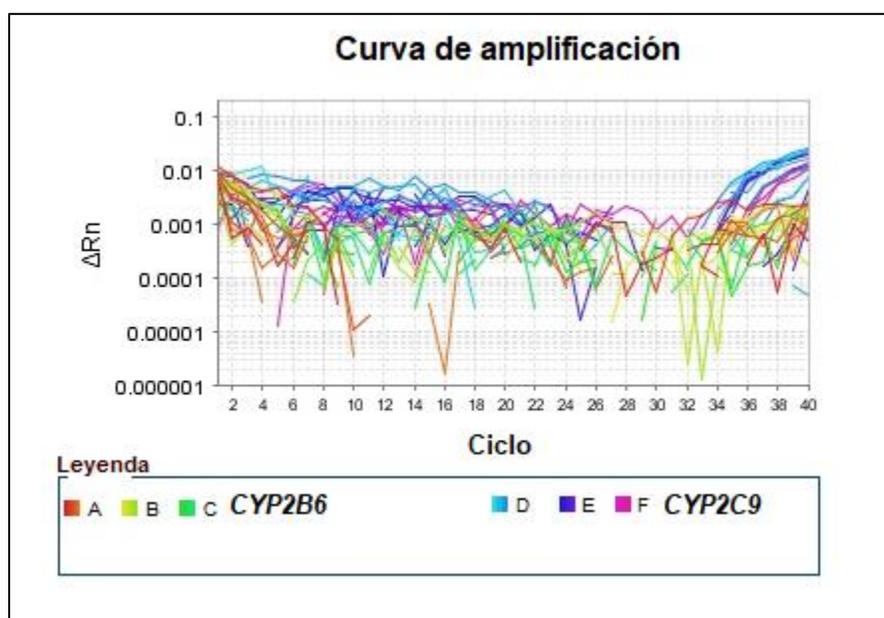


Figura 11. Curva de amplificación de *CYP2B6* y *CYP2C9*.

El CYP2B6 se expresa principalmente en el hígado y presenta polimorfismos genéticos extensos⁶⁰, lo que provoca que su actividad sea muy variable en la población. Así mismo, se sabe que constituye solo una pequeña fracción del P450 hepático total y se expresa a bajos niveles⁶⁰. A nivel de proteína, CYP2B6 no es detectado hasta en un tercio de las muestras pediátricas⁶². A su vez, se ha reportado que la expresión de *CYP2B6* hepático depende del género pues al analizar un total de 81 muestras de hígados humano, se encontró que los hombres tenían una menor cantidad de mRNA de *CYP2B6*, de proteína y actividad que las mujeres, y que

además 20% de los varones era metabolizadores pobres por la presencia de polimorfismos en *CYP2B6*⁶³.

Por su parte, el *CYP2C9* también es altamente polimórfico en humanos, teniendo al menos siete polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que podrían tener impacto en la contribución de *CYP2C9* a la 4-hidroxilación de la ciclofosfamida⁶⁴. Por lo tanto, el hecho de no encontrar niveles de expresión de *CYP2* detectables en la línea celular SJCRH30 bajo las condiciones evaluadas, podría deberse al género y edad del individuo del que proviene la línea celular estudiada en este trabajo.

10.3.2 *CYP3A4*

El hecho de que haya habido efecto citotóxico en las células SJCRH30 resulta contradictorio, siendo que el principal metabolizador de la ciclofosfamida, el *CYP2B6*, tuvo niveles de expresión génica no detectables. Sin embargo, se ha reportado que otros citocromos como *CYP3A* pueden llevar a cabo la activación de la ciclofosfamida.⁶⁵

El *CYP3A4* es una de las principales enzimas humanas P450 que cataliza la reacción de *N*-dicloroetilación de la ciclofosfamida, lo que dirige la reacción a la formación de 2-dicloetilciclofosfamida, el cual puede causar daño a los túbulos proximales y a las neuronas, y por lo tanto es ampliamente responsable de la nefrotoxicidad y neurotoxicidad⁶⁶. Entonces, su sobreexpresión nos podría hablar más de la formación de este compuesto que de la 4-hidroxiciclofosfamida.

Del análisis estadístico de los niveles de expresión génica de *CYP3A4* respecto al gen endógeno ciclofilina A se hallaron diferencias significativas entre las células tratadas del día 21 con los días 7 y 28 (Figura 14), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas de los niveles de expresión relativa de *CYP3A4* entre las células controles (Figura 13) ni entre las células tratadas con ciclofosfamida frente a sus controles sin tratamiento (Figura 12).

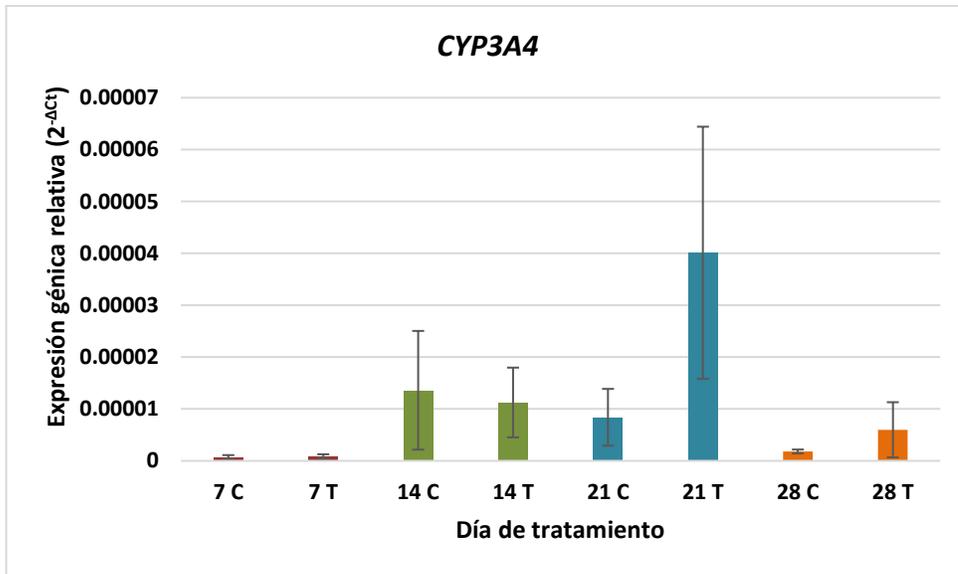


Figura 12. Expresión génica relativa de *CYP3A4* respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis del tratamiento respecto al control de cada tiempo evaluado. Donde C es control y T es tratado, [Ciclofosfamida] = 2 mM. Análisis estadístico por prueba t-student para cada día individual.

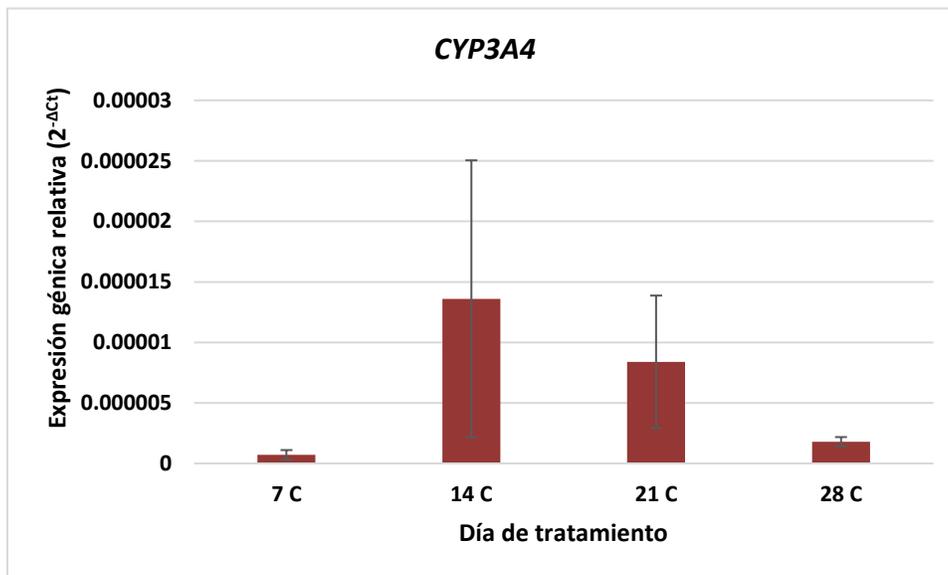


Figura 13. Expresión génica relativa de *CYP3A4* respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células controles de cada tiempo evaluado. Análisis estadístico por ANOVA ($p = 0.1155$).

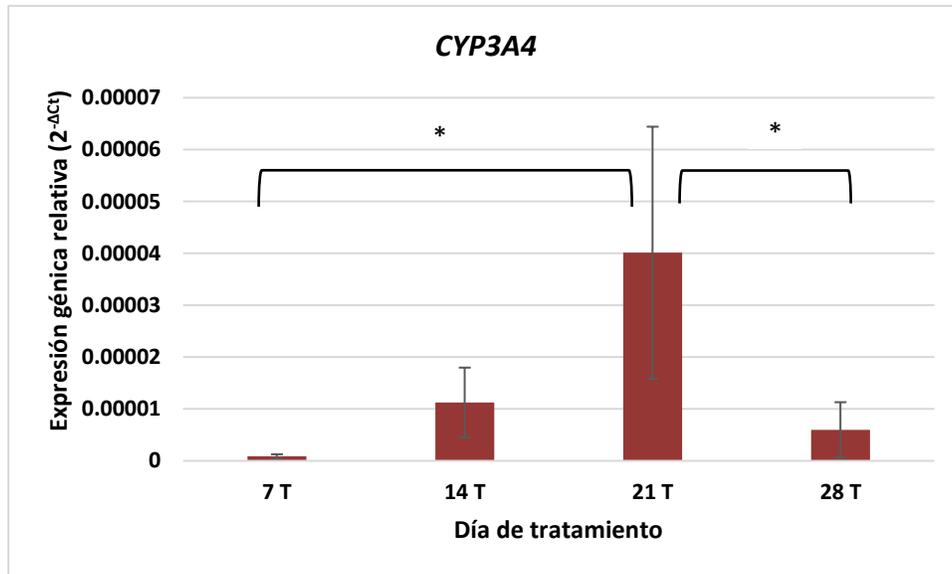


Figura 14. Expresión génica relativa de *CYP3A4* respecto al gen endógeno ciclofilina
A. Análisis entre las células tratadas de cada tiempo evaluado. [Ciclofosfamida] = 2 mM.
 Análisis estadístico por ANOVA y análisis post-hoc por Tukey en donde * $p < 0.05$.

Al analizar las veces de cambio entre la expresión génica de *CYP3A4* en las células tratadas con ciclofosfamida frente a las células controles, no hubo diferencia significativa entre ninguna de las muestras a los periodos de tiempo evaluados (Figura 15).

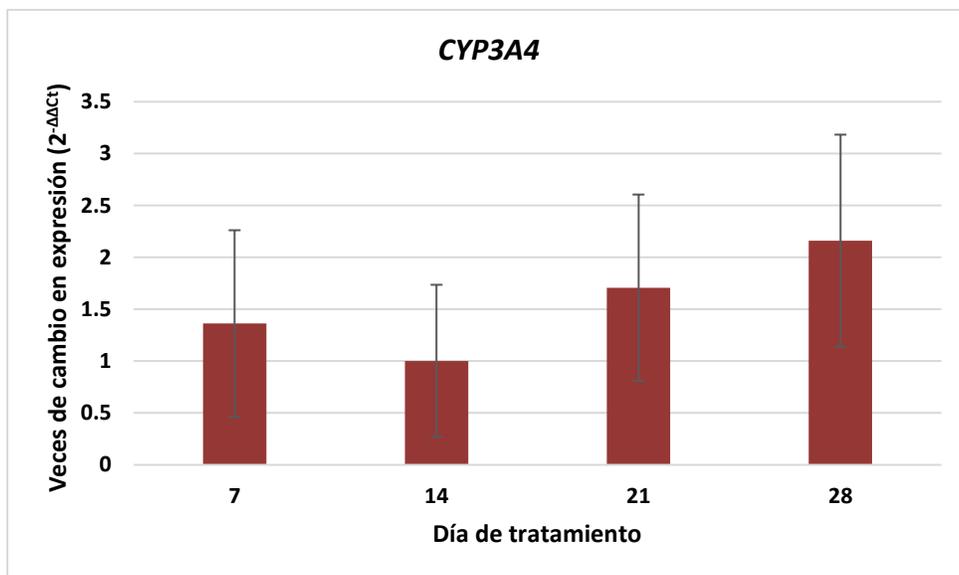


Figura 15. Veces de cambio en la expresión de *CYP3A4* en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento. [Ciclofosfamida] = 2 mM. Análisis por ANOVA ($p = 0.4748$).

10.3.3 *CYP3A5*

CYP3A5 mostró una mayor expresión génica relativa que *CYP3A4* (Figura 16). La comparación de la expresión relativa de este gen entre las células control (Figura 17) y entre las células tratadas (Figura 18) mostraron diferencias significativas, y se observó que, a mayor tiempo de exposición al tratamiento con ciclofosfamida, hay mayores cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión de *CYP3A5* (Figura 19).

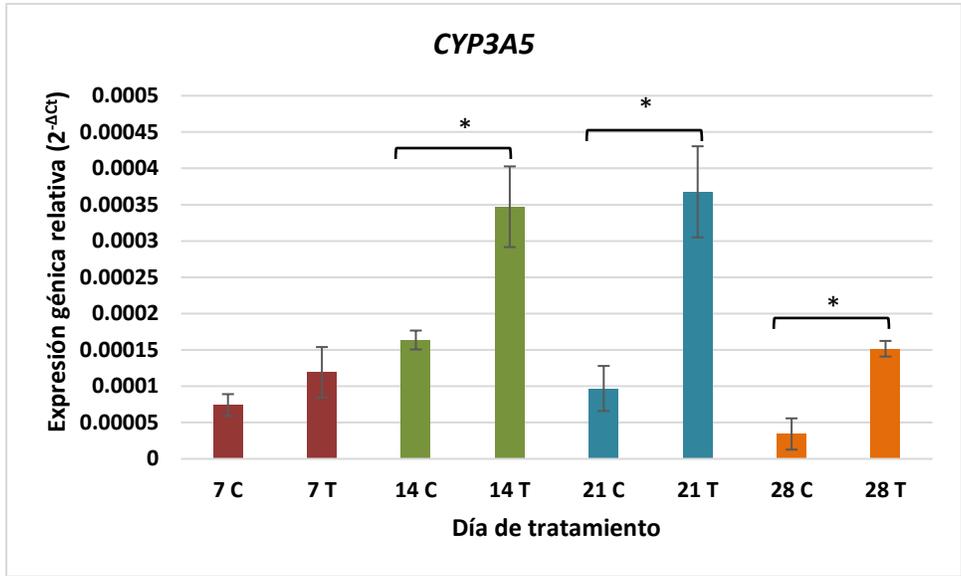


Figura 16. Expresión génica relativa de *CYP3A5* respecto al gen endógeno ciclofilina
A. Análisis del tratamiento respecto al control de cada tiempo evaluado. Donde C es control y T es tratado, [Ciclofosfamida]= 2 mM. Análisis estadístico por la prueba t-student para cada día individual siendo *p < 0.05.

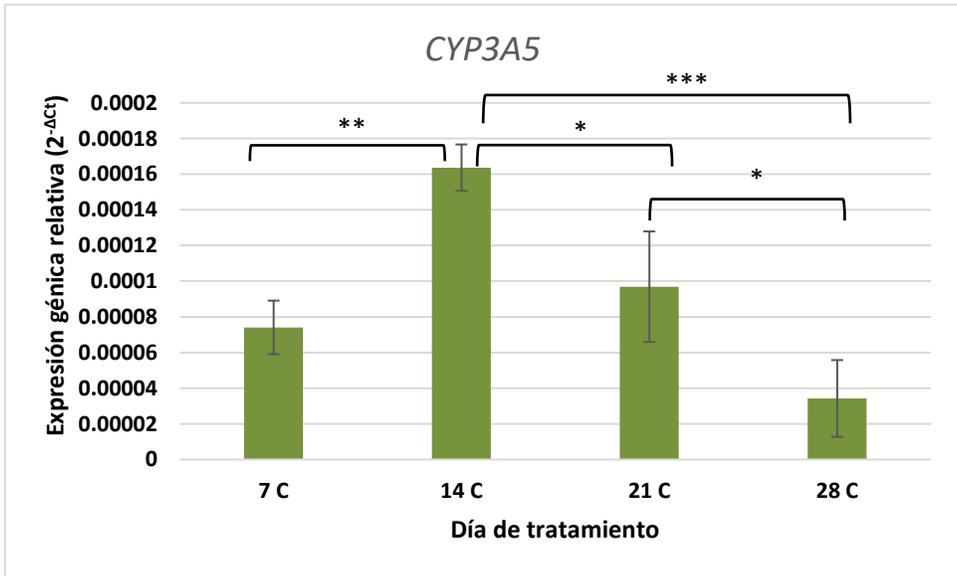


Figura 17. Expresión génica relativa de *CYP3A5* respecto al gen endógeno ciclofilina
A. Análisis entre las células controles de cada tiempo evaluado. Análisis estadístico por ANOVA y análisis post-hoc por Tukey en donde *p < 0.05, **p < 0.005 y ***p < 0.001.

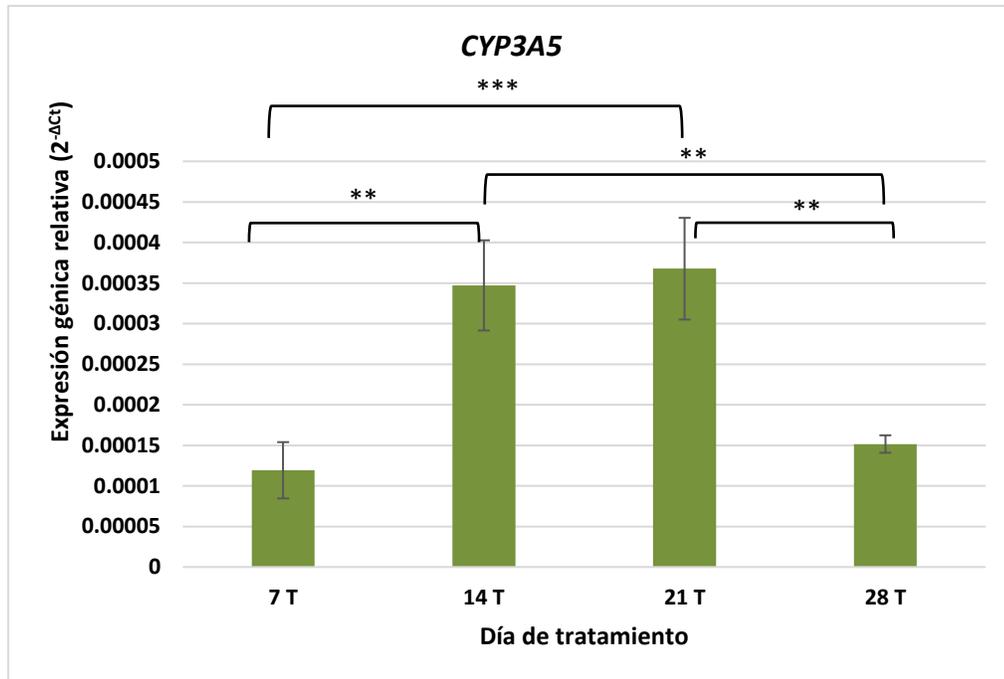


Figura 18. Expresión génica relativa de *CYP3A5* respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células tratadas de cada tiempo evaluado. [Ciclofilina] = 2 mM. Análisis estadístico por ANOVA y análisis post-hoc por Tukey, en donde $p < 0.005$ y $***p < 0.001$.**

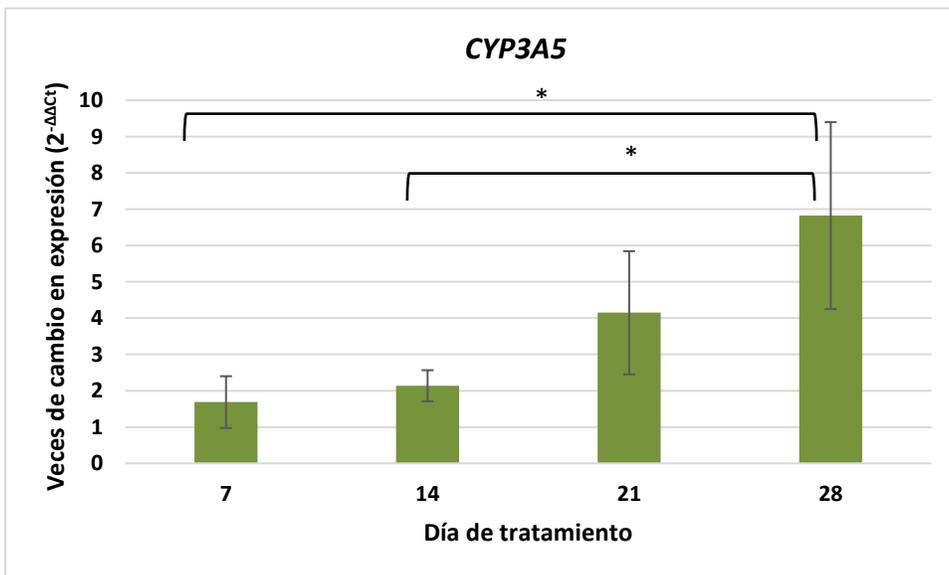


Figura 19. Veces de cambio en la expresión de *CYP3A5* en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento. [Ciclofosfamida] = 2 mM. Análisis estadístico por ANOVA y análisis post-hoc por Tukey, en donde $*p < 0.05$.

CYP3A5 es considerado la segunda proteína CYP3A más importante en el hígado, presente en el 10 - 97% de muestras de hígados humanos⁶⁷ y participa tanto en la formación de 4-hidroxiciclofosfamida como de dicloroetilciclofosfamida cuando se administran altas concentraciones de ciclofosfamida (0.7 a 5 mM)^{29, 68, 65, 69}. Con los resultados obtenidos, se puede sugerir que, si bien este CYP no está homogéneamente incluido en la literatura como participante importante del proceso del metabolismo de la ciclofosfamida, éste está implicado en el desarrollo de quimiorresistencia a ciclofosfamida en la línea celular utilizada.

Debido a que el *CYP3A5* fue el gen que mostró mayor modulación por el tratamiento con el agente antineoplásico, se realizaron ensayos de Western blot para determinar el nivel de expresión proteica de dicho CYP. Sin embargo, con este método no se detectó a la proteína en las muestras analizadas (Figura 20).

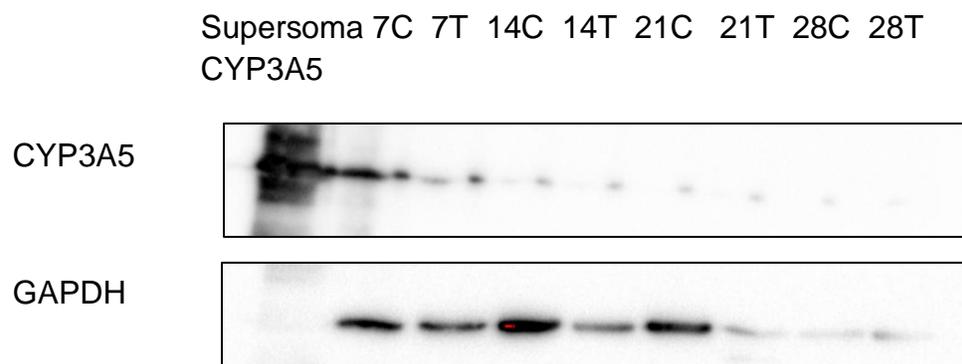


Figura 20. Expresión proteica de CYP3A5 en células SJCRH30 expuestas a ciclofosfamida. Donde C corresponde a las células control y T a las células tratadas con ciclofosfamida 2 mM. Se utilizaron 20 µg de proteína total de las muestras y las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-CYP3A5 toda la noche y con el secundario durante 1 h.

10.3.4 ABCC2

ABCC2 media el transporte de la ciclofosfamida como un complejo de glutatiónilo y participa en la eliminación final de fármacos y metabolitos tóxicos endógenos en hígado, riñón, intestino y placenta⁷⁰. No obstante, su papel en la resistencia a fármacos ha sido poco estudiado. El gen *ABCC2* se expresó en todas las muestras tratadas en menores niveles comparado con los controles sin tratamiento (Figura 21). Tanto la comparación múltiple de la expresión relativa del gen *ABCC2* entre las células controles (Figura 22) como la realizada entre las células tratadas (Figura 23) mostraron diferencia significativa entre el día 14 y 21; sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las veces de cambio en el nivel de expresión del gen *ABCC2* en función del día de tratamiento en ninguna de las muestras analizadas (Figura 24).

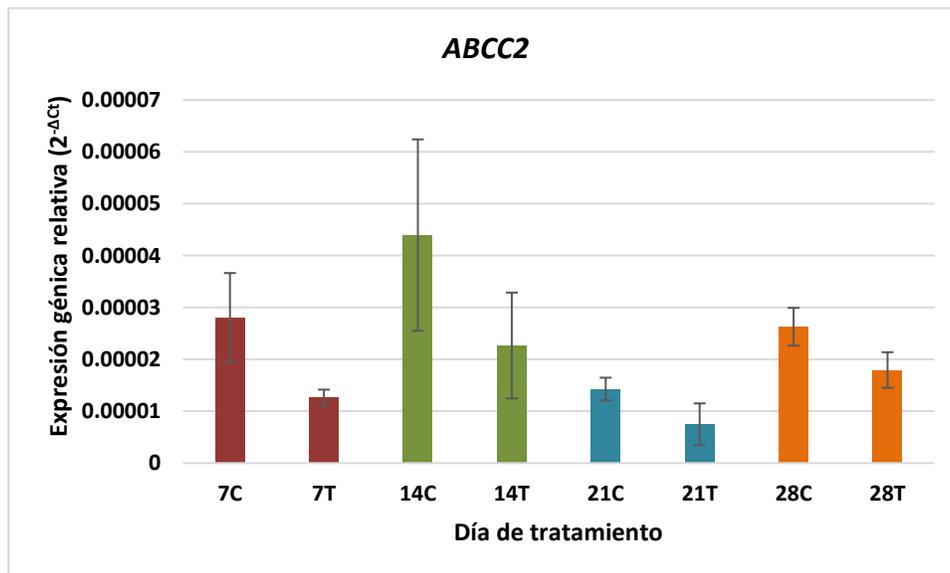


Figura 21. Análisis de la expresión génica relativa de *ABCC2* respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis del tratamiento respecto al control de cada día evaluado. Donde C es control y T es tratado, [Ciclofosfamida]= 2 mM. Análisis estadístico por la prueba t-student para cada día individual.

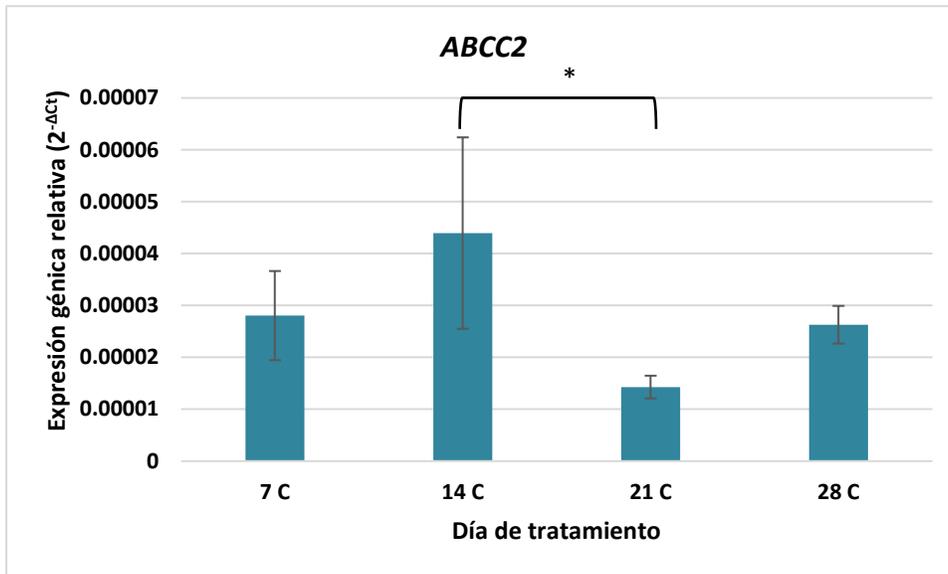


Figura 22. Expresión génica relativa de *ABCC2* respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células controles de cada tiempo evaluado; Análisis estadístico por ANOVA y análisis post-hoc por Tukey, en donde * $p < 0.05$.

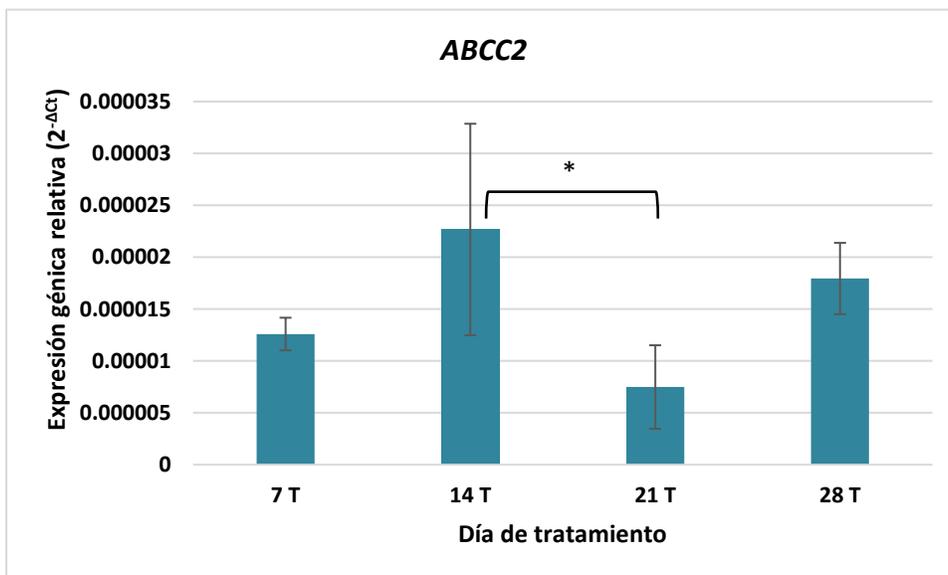


Figura 23. Expresión génica relativa de *ABCC2* respecto al gen endógeno ciclofilina A. Análisis entre las células tratadas de cada día evaluado. [Ciclofosfamida] = 2 mM. Análisis estadístico por ANOVA y análisis post-hoc por Tukey, en donde * $p < 0.05$.

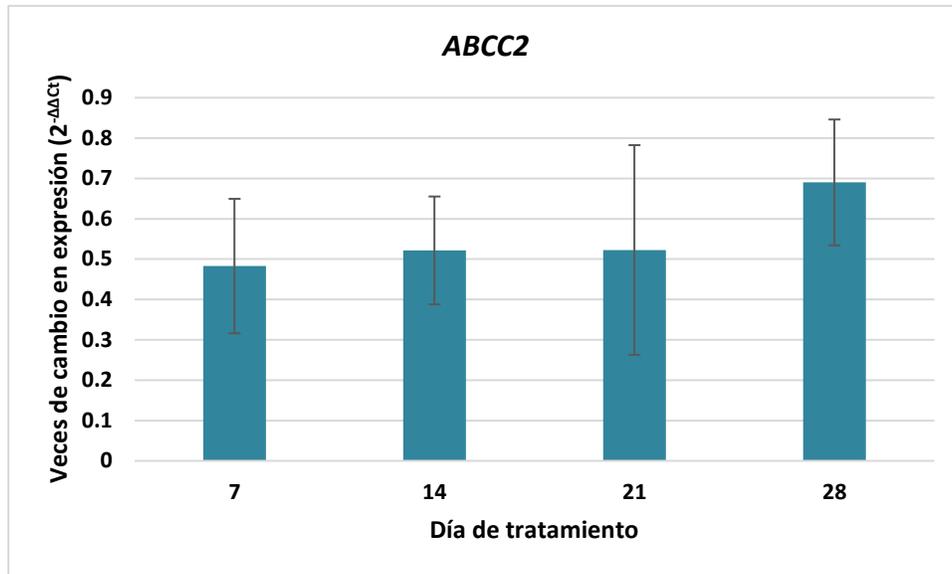


Figura 24. Veces de cambio en la expresión de *ABCC2* en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento. [Ciclofosfamida] = 0.2 Mm. Análisis estadístico por ANOVA ($p = 0.5547$)

Si bien se ha encontrado que *ABCC2* se sobreexpresa en líneas celulares resistentes a cisplatino y carboplatino y que es un importante factor de resistencia contra otros agentes anticancerígenos como metotrexato, vinblastina y derivados de camptotecina⁷¹, los resultados sugieren que *ABCC2* no participa en la resistencia adquirida a ciclofosfamida en la línea celular evaluada.

10.3.5 Glicoproteína-P

La resistencia a fármacos antineoplásicos mediada por transportadores de tipo ABC en las líneas celulares Rh18, Rh36, SCMC, HX170 y RD de RMS ha sido atribuida a la sobreexpresión de glicoproteína-P⁷². Al cuantificar los niveles de expresión de glicoproteína-P en las muestras se observó diferencia significativa en las cantidades de proteína de este transportador de fármacos como resultado del tratamiento con ciclofosfamida en los días 7 y 21 (Figura 25), donde la concentración de proteína en ambos casos fue menor en el grupo tratado que en el grupo control.

No se encontró diferencia significativa en las comparaciones entre las células controles (Figura 26), ni entre las células tratadas (Figura 27).

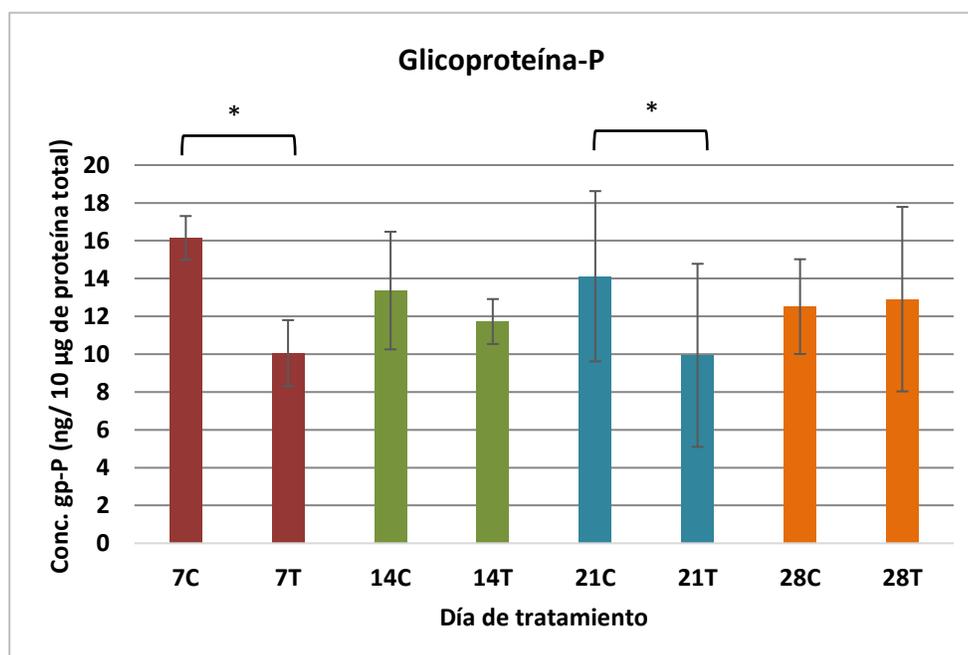


Figura 25. Expresión de glicoproteína-P en las células tratadas con ciclofosfamida con respecto a los controles sin tratamiento. Donde C es control y T es tratado, [Ciclofosfamida]= 2 mM. Análisis estadístico por la prueba t-student para cada día individual siendo * $p < 0.05$.

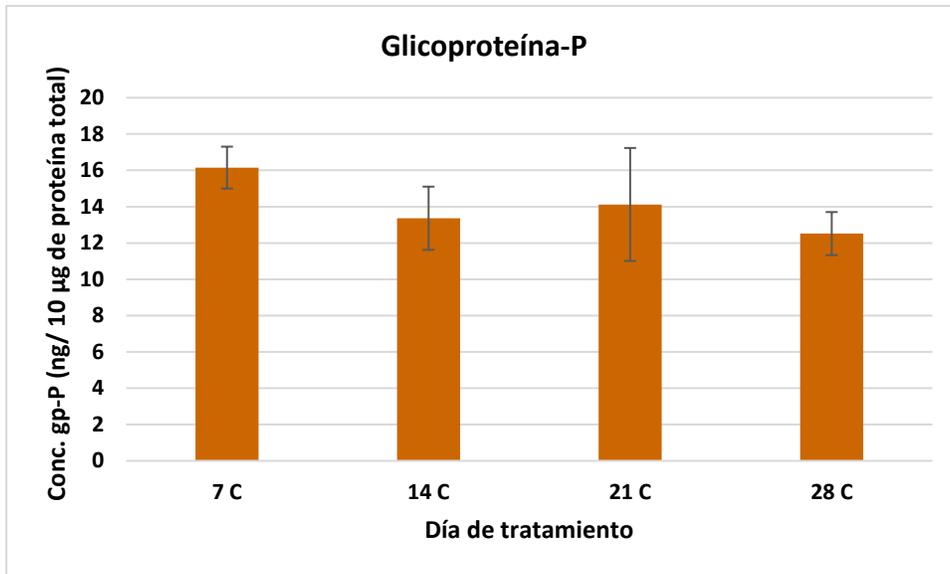


Figura 26. Expresión proteica de glicoproteína-P. Análisis entre las células controles de cada día evaluado. Análisis estadístico por ANOVA ($p=0.5415$).

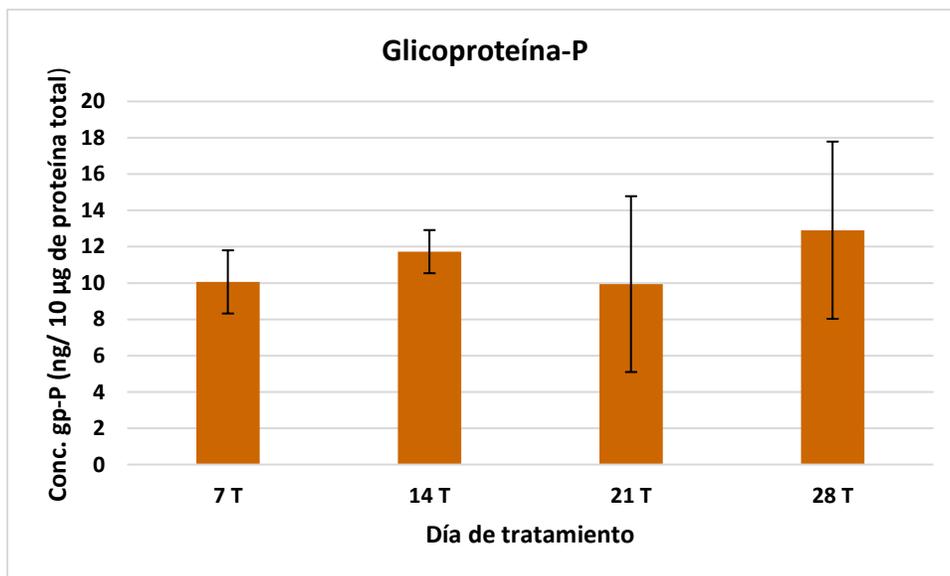


Figura 27. Expresión proteica de glicoproteína-P. Análisis entre las células tratadas de cada día evaluado. Análisis estadístico por ANOVA ($p=0.8472$).

Contrario a los hallazgos reportados en otras líneas celulares de RMS⁷², los resultados sugieren que la resistencia de las células SJCRH30 a ciclofosfamida no está mediada por glicoproteína-P. Esto podría deberse al subtipo histológico de RMS analizado. Seitz y colaboradores (2007)⁷³ determinaron que la glicoproteína-P no jugaba un papel en la resistencia *in vitro* a actinomicina D, vincristina, ifosfamida, topotecán y carboplatino en células de RMS embrional, pero sí en las células de RMS pleomórfico. A su vez, Komdeur y colaboradores (2003)⁷⁴ encontraron que, de 14 muestras analizadas, 71% de los tumores fueron positivos para glicoproteína-P y el subtipo de RMS estuvo asociado con diferentes comportamientos biológicos.

11 CONCLUSIÓN

El *CYP3A5* es el principal citocromo P450 que media la resistencia adquirida a ciclofosfamida de las células de rhabdomyosarcoma alveolar pediátrico (SJCRH30).

12 PERSPECTIVAS

Este trabajo exploró algunos de los mecanismos de quimiorresistencia en RMS pediátrico. Se planteó que en las células resistentes al tratamiento con ciclofosfamida se vería aumentada la expresión de los CYP y transportadores que participan en su metabolismo, disminuyendo de esta forma el tiempo en que se excreta y, por lo tanto, ocasionando menor citotoxicidad en las células cancerosas; sin embargo, únicamente se encontró modulación de *CYP3A5* por el agente antineoplásico. Aunado a esto, las células fueron quimiosensibles durante los primeros 14 días de tratamiento, tal vez debido a la alta concentración del fármaco en sí y no necesariamente por la bioactivación intracelular de éste. Por ello, para determinar la ruta metabólica y las enzimas responsables del efecto citotóxico observado se podría cuantificar la producción de los metabolitos 4-hidroxíciclofosfamida y 2-dicloetilciclofosfamida. Otra alternativa sería evaluar los niveles de expresión de otros genes y enzimas como *CYP2C19*, LRP (Proteína de resistencia de cáncer de pulmón), MRP1, ALDH1A1 y ALDH3A1 que se han visto correlacionadas con la resistencia a agentes antineoplásicos en otros tipos de cáncer. También se podrían realizar ensayos con inhibidores de estos genes y proteínas para confirmar su participación en el fenómeno de quimiorresistencia, frente a uno o varios fármacos.

Otro punto para considerar es que los resultados estuvieron acotados a las características de la línea celular utilizada. Para poder tener un conocimiento más completo acerca de la quimiorresistencia en RMS pediátrico, se podría evaluar la resistencia no solo a ciclofosfamida, sino a otro tipo de medicamentos para el tratamiento del cáncer en México como vincristina y actinomicina D, ya sea mediante administración individual o en combinación; además de emplear otras líneas celulares de diferentes subtipos histológicos de RMS derivadas de pacientes que recibieron diferentes tratamientos.

13 ANEXOS

13.1 Evaluación de la integridad de RNA por electroforesis

Por cada gel individual, se disolvieron 0.45 g de agarosa en 30 mL de buffer TBE 1x (tris-borato-EDTA) con ayuda de calentamiento. Una vez lograda una completa disolución de la agarosa, se agregaron 3 μ L de GelRed® Nucleic Acid Stain y la disolución final se agregó a la cámara correspondiente para su gelificación. Una vez gelificado, se montó en la cámara de electroforesis horizontal y se quitó el peine para formación de pozos, en seguida se agregó buffer TBE 1x.

A continuación, los pozos se llenaron con volúmenes equivalentes a 500 ng de RNA de cada muestra, 2 μ L de buffer de carga y agua DEPC hasta un volumen final de 10 μ L.

Una vez cerrado el circuito en la cámara horizontal, la electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante el tiempo necesario en el que se observó el corrimiento de bandas hasta $\frac{3}{4}$ partes de la longitud total del gel.

Finalmente, el revelado de las bandas en los geles se realizó en un transiluminador UV (Figura 28).

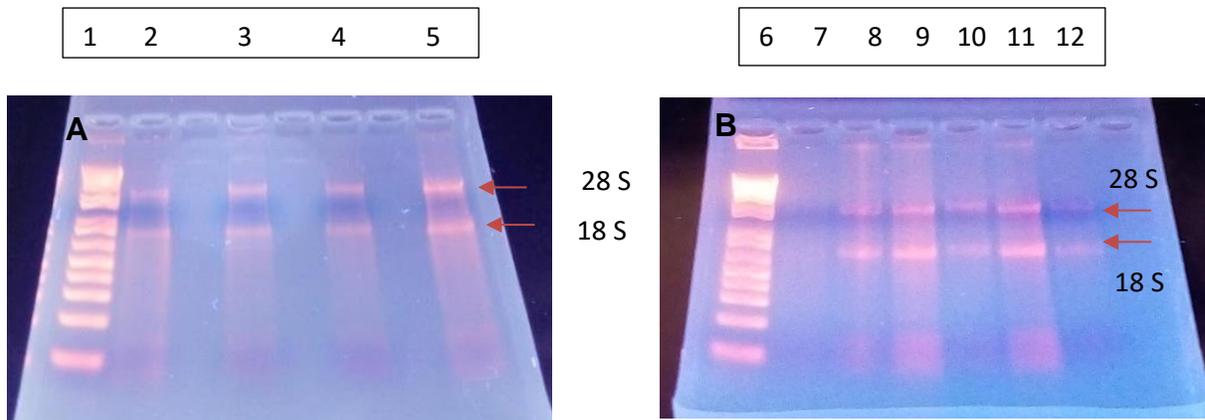


Figura 28. Electroforesis de RNA en geles de agarosa. Las bandas señaladas con las flechas rojas, corresponden a la subunidad mayor (28S) y menor ribosomal (18S). El gel A muestra los carriles 1, 2, 3, 4 y 5, mientras que el B, los carriles 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Su correspondencia con las muestras se encuentra descrito en el cuadro 3.

Cuadro 3. Distribución de muestras en los carriles de los geles de agarosa.

Carril	Muestra
1 y 6	Marcador de peso
2	Día 3 control
3	Día 3 tratada
4	Día 7 control
5	Día 7 tratada
7	Día 14 control
8	Día 14 tratada
9	Día 21 control
10	Día 21 tratada
11	Día 28 control
12	Día 28 tratada

13.2 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry

13.2.1 Preparación de solución estándar de BSA (albúmina de suero bovino)

Se preparó una solución de BSA a una concentración de 1 mg/mL. Para ello, se ajustó la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 280 nm en un valor de 0.668.

13.2.2 Preparación de solución de trabajo de BSA

Por cada curva de BSA se preparó una solución de 0.2 mg/mL de BSA a través de 400 μ L de solución estándar de BSA en 1600 μ L de agua desionizada.

13.2.3 Curva estándar de BSA

Para la cuantificación de cada muestra de proteínas totales se realizó una curva con concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 μ g de la solución de BSA, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente cuadro 4.

Cuadro 4. Volúmenes de solución de trabajo de BSA y agua destilada necesarios para obtener la cantidad de BSA (μ g) de cada punto de la curva estándar.

μ g de BSA	Volumen de solución de trabajo de BSA (μ L)	Agua destilada (μ L)
0	0	500
20	100	400
40	200	300
60	300	200
80	400	100
100	500	0

13.2.4 Preparación de las muestras

Se tomaron 3.34 μL de muestra en 1 mL de agua destilada y a continuación se realizó una dilución 1:2 de la solución anterior, de tal forma que se tuvieron dos diluciones 1:300 y 1:600. Cada una de las diluciones se hicieron por triplicado.

13.2.5 Cuantificación

Una vez que se tuvieron los tubos de la curva y los de las diluciones de las muestras, se adicionaron, a cada uno, 1.5 mL del reactivo 1 y se dejaron incubar los tubos por 10 min a temperatura ambiente. Posterior a la incubación, se agregaron 150 μL del reactivo 2 y se incubaron nuevamente los tubos durante 30 min en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente.

Después de la incubación, las soluciones de reacción de la curva estándar fueron transferidas a celdas de 3 mL y se determinó la absorbancia a 750 nm en el espectro de luz visible; en seguida se realizó el mismo procedimiento para la lectura de las muestras, cuyas absorbancias fueron directamente proporcionales a una concentración de proteína total, de acuerdo con la curva estándar.

13.2.5.1 Preparación de reactivos

Reactivo 1.

1 mL de solución de tartrato de Na^+/K^+ [0.07 M], 1 mL de solución de sulfato de cobre [0.06 M] y 100 mL de una solución de hidróxido de sodio [0.10 M] y carbonato de sodio [0.20 M].

Reactivo 2.

Dilución de una parte de reactivo de Folin y dos partes de agua destilada.

13.3 Sondas utilizadas en PCR

CYP3A4 humano: Thermo Fisher Scientific Hs00430021_m1

CYP3A5 humano: Thermo Fisher Scientific Hs01070905_m1

CYP2B6 humano: Thermo Fisher Scientific Hs01020676_g1

CYP2C9 humano: Thermo Fisher Scientific Hs01682803_MH

ABCC2 humano: Thermo Fisher Scientific Hs00960509_m1

Ciclofilina A (*PPIA*): RCF 4332647 Lote: 1410020XP110718-004All.

13.4 Preparación de reactivos para ELISA y Western Blot

PBS 0.01M: (8×10^{-3} g NaCl, 2×10^{-4} g KCl, 2.7×10^{-4} g KH_2PO_4 , 14.2×10^{-4} g Na_2HPO_4) / mL H_2O desionizada. Ajustado a pH 7.2

Buffer de transferencia 8X: (2.4×10^{-2} g Tris base, 0.12 g Glicina) / mL H_2O desionizada

TBS 10X: (6×10^{-2} g Tris base, 8.8×10^{-2} g NaCl) / mL H_2O desionizada. Ajustado a pH 7.6

Buffer de corrida 5X: (7.2×10^{-2} g Glicina, 1.5×10^{-2} g Tris Base, 5×10^{-3} g SDS) / mL H_2O desionizada. Ajustado a pH 8.3

Acrilamida: 0.292 g acrilamida, 8×10^{-2} g Bis-acrilamida/ mL H_2O desionizada. Posteriormente se filtró con un poro de $0.45 \mu\text{M}$

13.5 Anticuerpos utilizados

13.5.1 Western Blot

Anticuerpo primario CYP3A5: Abcam ab108624 Monoclonal rabbit.

Anticuerpo primario GAPDH: Abcam ab128915 Monoclonal rabbit

Anticuerpo secundario: Abcam H&L (HRP) ab205718 Goat anti-rabbit IgG.

13.5.2 ELISA

Anticuerpo primario: Abcam ab168337 Anti-P Glycoprotein antibody [EPR10364]
Monoclonal rabbit. Lot. GP121914-10.

Anticuerpo secundario: Abcam H&L (HRP) ab205718 Goat anti-rabbit IgG.

14 REFERENCIAS

1. Sun, X., Guo, W., Shen, J. K., Mankin, H. J., Hornicek, F. J., & Duan, Z. (2015). Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*. 2015; 2015:232010.
2. López Pousa Antonio (2006). Tratamiento de los Sarcomas de Partes Blandas. *IX Congreso Nacional de la SEOM*. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/comunicaciones/tenerife/ix_tenerife043.pdf
3. Theodor H. Lippert, Hans-Jörg Ruoff, Manfred Volm *Arzneimittelforschung* (2008). Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung Drug Research*, 58(6): 261–264.
4. Gottesman, M. M., & Ambudkar, S. V. (2001). Overview: ABC Transporters and Human Disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(6), 453–458.
5. C. Morag, E. McFadyen, T. William, Murray Melvin and Graeme I. (2004). Cytochrome P450 enzymes: Novel options for cancer therapeutics, *Molecular Cancer Therapeutic*, 3 (3) 363-371.
6. Kelley William N., *Medicina interna*, Vol.1, Argentina, Ed. Médica Panamericana, 1993, p. 1184.
7. American Cancer Society, About Soft Tissue Sarcoma, 2019. [Fecha de consulta: 03 sep. 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/soft-tissue-sarcoma/about.html>.
8. Froehner, M., & Wirth, P. M. (2001). Etiologic factors in soft tissue sarcomas. *Onkologie*, 24(2), 139–142. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000050301>
9. Katenkamp, K., & Katenkamp, D. (2009). Weichgewebstumoren - Neue Gesichtspunkte zur Klassifikation und Diagnostik. *Deutsches Ärzteblatt*, 106(39), 632–636. Disponible en: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0632>
10. American Cancer Society, Etapas del Sarcoma de Tejidos Blandos, 2018. [Fecha de consulta: 06 sep. 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/sarcoma-de-tejidos-blandos/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-por-etapas.html>
11. INFOcáncer, Clasificación por etapas- Sarcomas de tejidos blandos, 2019. [Fecha de consulta: 22 oct 2019]. Disponible en: <https://www.infocancer.org.mx/?t=clasificacion-etapas-sarcoma-tejidos-blandos>.
12. Du, S., Meng, L., Song, L., Zhang, P., Shou, X., Liu, C., & Li, F. (2018). Safety markers for rhabdomyosarcoma cells using an in vivo imaging system. *Oncology Letters*, 16, 1031-1038. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8789>
13. DM Parham and DA Ellison (2006). Rhabdomyosarcomas in adults and children: An update. *Arch Pathol Lab Med*, 130: 1454-1465. Disponible en:

<https://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.1043/1543-2165%282006%29130%5B1454%3ARIAACA%5D2.0.CO%3B2>

14. Kashi VP, Hatley ME and Galindo RL (2015). Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: Insights from complementary model systems. *Nat Rev Cancer* 15: 426-439.
15. Diagnóstico y Tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas (Rabdomiosarcoma) en el Paciente Pediátrico. México: Secretaría de Salud; 2010.
16. “Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)”, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, comunicado de prensa núm. 61/18 2 de febrero de 2018 página 1/13.
17. Parham, D. M., & Barr, F. G. (2013). Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis. *Advances In Anatomic Pathology*, 20(6), 387- 397. Disponible en: <https://europepmc.org/articles/PMC6637949?sessionid=08E9B1D7607F8EB05934D378ACEAF8F2>
18. Kashi VP, Hatley ME and Galindo RL (2015). Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: Insights from complementary model systems. *Nat Rev Cancer*, 15: 426-439.
19. Zhang, M., Linardic, C. M., & Kirsch, D. G. (2013). RAS and ROS in rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*, 24(6), 689–691. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3985483/>
20. Stevens, M. C. (2005). Treatment for childhood rhabdomyosarcoma: the cost of cure. *The Lancet Oncology*, 6(2), 77–84. Disponible en: [https://doi:10.1016/s1470-2045\(05\)01733-x](https://doi:10.1016/s1470-2045(05)01733-x)
21. Terezakis, S. A., & Wharam, M. D. (2013). Radiotherapy for Rhabdomyosarcoma: Indications and Outcome. *Clinical Oncology*, 25(1), 27–35. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.clon.2012.07.009>
22. Wu, X.-Z. (2006). A new classification system of anticancer drugs – Based on cell biological mechanisms. *Medical Hypotheses*, 66(5), 883–887. Disponible en; <https://doi:10.1016/j.mehy.2005.11.036>
23. American Cancer Society, Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia, 2016. [Fecha de consulta: 20 sep. 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>
24. Benedí Juana, Gómez del Río M. Ángeles (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*, 20(2), 60-65.
25. Didier, Lanore, Christel Delprat, *Quimioterapia anticancerosa*, España. Ed. Masson, 2004, pp. 5-6.

26. Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., ... Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3(11), 1389–1407. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.dnarep.2004.05.004>
27. Lüman Heinz, Mohr Klaus, Hein Lutz, *Farmacología Texto y Atlas*, Ed. Panamericana, España, 2010, pp. 280, 282.
28. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cyclophosphamide, CID=2907, [Fecha de consulta: 25 sep. 2019]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclophosphamide>
29. Drug Bank, Cyclophosphamide, 2005. [Fecha de consulta: 25 sep. 2019] Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00531>
30. Lorenzo P. et al, *Farmacología básica y clínica/ Velázquez*, 18ª ed, España. Ed. Panamericana, 2008, p. 567.
31. Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). *Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), 638–647. doi:10.1038/nrclinonc.2009.146.
32. PharmGKB, Shukla Sunita et.al, Cyclophosphamide Pathway, Pharmacokinetics, 2019. [Fecha de consulta: 24 sep 19]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2034/overview>.
33. M. Whirl-Carrillo, E.M. McDonagh, J. M. Hebert, L. Gong, K. Sangkuhl, C.F. Thorn, R.B. Altman and T.E. Klein (2012). Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(4): 414-417.
34. Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). *Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), 638–647. Disponible en: <https://doi:10.1038/nrclinonc.2009.146>.
35. Longley DB, Johnston PG (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205:275–292. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1706>
36. Klopfleisch, R., Kohn, B., & Gruber, A.D. (2016). *Mechanisms of tumor resistance against chemoterapeutic agents in veterinary oncology*. Veterinary Journal. Bailliere Tindall LTd. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.015>.
37. Rebutti, M., & Michiels, C. (2013) Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1219-1226. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.bcp.2013.02.017>.
38. Gillet, J.-P., & Gottesman, M. M. (2009). *Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. Multi-Drug Resistance in Cancer*, Methods Mol Biol, 596; 47–76. Disponible en: https://doi:10.1007/978-1-60761-416-6_4

39. Leslie, E.M, Deeley, R.G., & Cole, S.P.C. (2005). Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 216–237. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>
40. González Ramón, (1994). Resistencia tumoral a múltiples agentes antineoplásicos mediada por glucoproteína P: del laboratorio a la clínica. *Med Clin (Barc)*, 102(13):506-15.
41. Ruiz Gómez M. J. et.al., *La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer*, AN. MED. INTERNA (Madrid) Vol. 19, N.º 9, pp. 477-485, 2002.
42. Glavinas, Hristos & Cserepes, Judit & Sarkadi, Balázs. (2004). The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current drug delivery*. 1(1): 27-42. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/1567201043480036>.
43. Verma, H., Bahia, M. S., Choudhary, S., Singh, P. K., & Silakari, O. (2019). Drug Metabolizing Enzymes-Associated Chemo Resistance and Strategies to Overcome it. *Drug Metabolism Reviews*, 51(2):196-223. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1632886>
44. Sim, S. C., & Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Human genomics*, 4(4), 278–281. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-278>
45. Babashah, Sadegh. (2015). *Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in Translational Oncology*. Springer, Iran, p 488 doi:10.1007/978-3-319-21030-8
46. Gatti, L., & Zunino, F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods in molecular medicine*, 111, 127-48.
47. Thermo Fisher Scientific Inc., [Fecha de consulta: 02 oct 2019]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/neubauer-counting-chambers-4/p-8004312>
48. Thermo Fisher Scientific Inc., Guía del usuario NanoDrop One, 2016. [Fecha de consulta: 10 oct 2019]. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>
49. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measure with the Folin method reagent. *J. Biof. Chem*, 193, 265- 275.
50. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method*. *Methods*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
51. Guía de Práctica clínica, CENETEC. Diagnóstico y tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas (Rabdomiosarcoma) en el paciente pediátrico. [Fecha de consulta: 23 oct 2019]. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/484_GPC_SarcomasPartesBlandas/SSA-484-11-rabdomiosarcoma_RR.pdf

52. Heinicke Ulrike, Kupka Johanna and Fulda Simone (2015). JNJ-26481585 primes rhabdomyosarcoma cells for chemotherapeutics by engaging the mitochondrial pathway of apoptosis. *Oncotarget*, 6(35): 37836–37851. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741969/pdf/oncotarget-06-37836.pdf>
53. Hinson Ashley R. P., Jones Rosanne, Crose Lisa E. S., Belyea Brian C., Barr Frederic G. and Linardic Corinne M. (2013). Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol*, 3(183) 1-12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00183/full>
54. Cocker, H. A., Pinkerton, C. R., & Kelland, L. R. (2000). Characterization and modulation of drug resistance of human paediatric rhabdomyosarcoma cell lines. *British journal of cancer*, 83(3), 338–345. Disponible en: <https://doi:10.1054/bjoc.2000.1273>
55. Fehm Tanja, Zwirner Manfred, Wallwiener Diethelm, Seeger Harald and Neubauer Hans (2012). Antitumor activity of zolenodric acid in primary breast cancer cells determined by the ATP tumor chemosensitivity assay, *BMC Cancer* ,12, 308. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-308>
56. Secretaría de salud de la Ciudad de México. Dirección de medicamentos, insumos y tecnología. Ficha técnica de ciclofosfamida. [Fecha de consulta: 23 oct 2019]. Disponible en: http://data.salud.cdmx.gob.mx/portal/images/infosalud/archivos/cuadrobasicoZIP/fichas_tecnicas_de_medicamentos_2016/Oncolog_ED_2016.pdf
57. Klunder, J. W., Komdeur, R., van der Graaf, W. T. A., de Bont, E. J. S. M., Hoekstra, H. J., van den Berg, E., & Molenaar, W. M. (2003). Expression of multidrug resistance–associated proteins in rhabdomyosarcomas before and after chemotherapy: The relationship between lung resistance–related protein (LRP) and differentiation. *Human Pathology*, 34(2), 150–155. Disponible en: <https://doi:10.1053/hupa.2003.10>
58. Cloven, N. (2004). In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 92(1), 160–166. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.ygyno.2003.09.030>
59. Campone M., Vavasseur F., Le Cabellec MT., Meflah K., Vallette FM and Oliver L. (2001). Induction of chemoresistance in HL-60 cells concomitantly causes a resistance to apoptosis and the synthesis of P-glycoprotein, *Leukemia*, 15, 1377-1387.
60. Xie H-J, Yasar Ü, Lundgren S, Griskevicius L, Terelius Y, Hassan M & Rane A. (2003). Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *The Pharmacogenomics Journal*, 3, 53-61. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6500157>
61. Small Molecule Pathway Database, Cyclophosphamide. [Fecha de consulta: 25 oct 2019]. Disponible en: <http://smpdb.ca/view/SMP0000604>
62. Zanger, U. M., & Klein, K. (2013). Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in genetics*, 4, 24. Disponible en: <https://doi:10.3389/fgene.2013.00024>.

63. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG.(2003). Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to CYP2B6 Genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) Expression, *J Pharmacol Exp Ther*, 307(3):906-22. Disponible en: <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=14551287>
64. Xie, H.-G., Prasad, H. C., Kim, R. B., & Stein, C. M. (2002). CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(10), 1257–1270. Disponible en: [https://doi:10.1016/s0169-409x\(02\)00076-5](https://doi:10.1016/s0169-409x(02)00076-5).
65. Ekhardt C, Doodeman VD, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. (2008). Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hidroxicyclophosphamide, *Pharmacogenet Genomics*, 18(6):515-23. Disponible en: <https://insights.ovid.com/crossref?an=01213011-200806000-00008>
66. Huang, Z., Roy, P., & Waxman, D. J. (2000). Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochemical Pharmacology*, 59(8), 961–972. Disponible en: [https://doi:10.1016/s0006-2952\(99\)00410-4](https://doi:10.1016/s0006-2952(99)00410-4).
67. Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y.-Q., Klein, K., Wojnowski, L. (2001). The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, 11(9), 773–779. Disponible en: <https://doi:10.1097/00008571-200112000-00005>.
68. Yule, S. M., Boddy, A. V., Cole, M., Price, L., Wyllie, R., Tasso, M. J., Idle, J. R. (1996). Cyclophosphamide pharmacokinetics in children. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 41(1), 13–19. Disponible en: <https://doi:10.1111/j.1365-2125.1996.tb00153.x>
69. Ren S, Yang JS, Kalthorn TF, Slattery JT. (1997). Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes, *Cancer Res*, 57:4229–4235.
70. Jedlitschky, G., Hoffmann, U., & Kroemer, H. K. (2006). Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(3), 351–366. Disponible en: <https://doi:10.1517/17425255.2.3.351>
71. Materna Verena, Pleger Juliane, Hoffmann Uwe, Lage Hermann (2004). RNA expresión of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase-I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemoterapeutic response, *Gynecologic Oncology*, 94(1), 152-160. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.03.035>
72. Melguizo C., et.al. (2011). Multidrug resistance and rhabdomyosarcoma (Review). *Oncology Reports*. 26(4):755-61. Disponible en: <https://doi:10.3892/or.2011.1347>

73. Seitz, G., Warmann, S. W., Vokuhl, C. O., Heitmann, H., Treuner, C., Leuschner, I., & Fuchs, J. (2007). Effects of standard chemotherapy on tumor growth and regulation of multidrug resistance genes and proteins in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatric Surgery International*, 23(5), 431–439. Disponible en: <https://doi:10.1007/s00383-006-1852-z>.
74. Komdeur, R., Plaat, B. E., van der Graaf, W. T., Hoekstra, H., Hollema, H., van den Berg, E., Molenaar, W. (2003). Expression of multidrug resistance proteins, P-gp, MRP1 and LRP, in soft tissue sarcomas analysed according to their histological type and grade. *European Journal of Cancer*, 39(7), 909–916. Disponible en: [https://doi:10.1016/s0959-8049\(03\)00029-7](https://doi:10.1016/s0959-8049(03)00029-7)