

11262



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD

“EXPRESIÓN DE MDR1 EN SARCOMAS PEDIÁTRICOS  
COMO FACTOR PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA  
AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE “

## TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
OSCAR ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ

TUTOR:  
DR. ROBERTO RIVERA LUNA  
COTUTOR:  
DR. ALBERTO OLAYA VARGAS



JULIO 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## INDICE TEMÁTICO

RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
Resistencia a la Quimioterapia en Sarcomas Pediátricos	3
Resistencia Múltiple a Fármacos	3
Expresión del Gen MDR1	3
Rabdomiosarcomas en Pediatría	5
Osteosarcomas en Pediatría	6
Sarcomas de Ewing en Pediatría	7
Detección de la Expresión del Gen MDR1	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVO	10
HIPOTESIS	10
DISEÑO DEL ESTUDIO	11
MATERIAL Y METODOS	11
Población Objetivo	11
Población Elegible	11
Criterios de Inclusión	11
Criterios de Exclusión	11
Criterios para la Estratificación	11
Cálculo del Tamaño Muestral	12
Método	12
Análisis Estadístico	13
RESULTADOS	15
Pacientes y Muestras de Tejido	15
Extracción de RNA y Análisis RT-PCR	16
Análisis Estadístico	17
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	18
ANEXOS	19
ANEXO I Definiciones Operacionales	19
ANEXO II Carta de Consentimiento Informado	22
ANEXO III Hoja de Recoleccion de Datos	24
ANEXO IV Tablas Y Figuras	25
BIBLIOGRAFIA	34

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alexander Alberto Pérez

Acuerdo

FECHA: 21 Julio 2009

FIRMA: [Firma]

## RESUMEN

El desarrollo de resistencia a la quimioterapia constituye un reto para la planeación de los esquemas antineoplásicos. El mecanismo de resistencia más estudiado involucra al gen *mdr1*. Hasta el momento la relación entre la expresión elevada de *mdr1* y el desarrollo de resistencia a la quimioterapia en pacientes pediátricos con Rbdomiosarcomas, Osteosarcomas y Sarcomas de Ewing no es concluyente, ya que existen controversias y diferencias en las metodologías utilizadas para la detección de la expresión del gen *mdr1* y para establecer la importancia que éste tiene como un factor pronóstico de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

Debido a esta problemática, se plantea la realización de un estudio, observacional, prospectivo, comparativo, prolectivo y transversal, cuyo objetivo principal es determinar la relación pronóstica de la expresión elevada del gen *mdr1* en los sarcomas de partes blandas y óseos de pacientes pediátricos con la respuesta temprana al tratamiento antineoplásico neoadyuvante. Este es el reporte del estudio piloto que se llevó al cabo para probar la factibilidad del proyecto.

La metodología plantea la inclusión de pacientes que ingresen al Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, menores de 18 años, de cualquier género y sin tratamiento antineoplásico previo y con autorización escrita en una carta de consentimiento informado.

Antes de iniciar el tratamiento antineoplásico de neoadyuvancia, se obtuvo una muestra de tejido neoplásico que se conservó en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. La determinación de la expresión del gen *mdr1* se realizó mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR). El análisis estadístico que se utilizó para conocer el peso específico de la expresión del gen *mdr1* como factor pronóstico fue la regresión logística multivariada polinómica (análisis de función discriminante) de cinco variables: expresión de *mdr1*, volumen tumoral inicial, tipo de neoplasia, variedad histológica y respuesta al tratamiento de neoadyuvancia, ésta última considerada la variable dependiente. Se incluyeron a cuatro hombres y dos mujeres, con una edad promedio de 81.7 meses, tres casos con diagnóstico de rbdomiosarcoma y tres más con sarcoma de Ewing. En 3 pacientes el sitio del tumor primario fue favorable y en los otros 3 el sitio fue desfavorable. La histología resultó desfavorable en cinco casos y favorable en uno. Todos los casos fueron estadios avanzados, dos en estadio 3 y cuatro en estadio 4. El promedio del volumen tumoral inicial resultó en  $1892\text{cm}^3$ , con valores mínimo y máximo de  $200\text{cm}^3$  y  $4500\text{cm}^3$ , respectivamente. El porcentaje de necrosis el promedio fue de 55%. El resultado de la determinación de la expresión de *mdr1* por RT-PCR fue de cuatro casos sin expresión y dos con expresión. Tras completar el tratamiento de neoadyuvancia, en 3 casos no hubo respuesta, un caso presentó respuesta parcial y dos casos respuesta completa. El análisis estadístico resultó sin significancia, aunque se debe tomar en cuenta el número muestral reducido para este estudio piloto.

Este estudio piloto comprueba la factibilidad del proyecto y logra detectar la problemática que puede afectarlo; tal es el caso del procedimiento de toma y almacenamiento del tejido neoplásico principalmente.

## INTRODUCCION

### Resistencia a la Quimioterapia en Sarcomas Pediátricos

La quimioterapia antineoplásica es una modalidad terapéutica importante en el manejo de los sarcomas de partes blandas y óseos en pacientes pediátricos. El desarrollo de resistencia a la quimioterapia constituye uno de los retos más importantes en la planeación de los esquemas de fármacos antineoplásicos a utilizar. Esta resistencia a la quimioterapia implica una falta de respuesta al tratamiento antineoplásico, resultando en progresión tumoral o en recaídas [1]. La quimiorresistencia se reporta hasta en el 75% de los pacientes con cáncer [2].

Existen muchos mecanismos asociados con la resistencia a fármacos antineoplásicos (MDR, del inglés *MultiDrug Resistance*). Hasta el momento estos mecanismos se han agrupado en tres tipos diferentes [3]: MDR clásica, MDR atípica y MDR no asociada a Glicoproteína-P, de este último grupo se mencionan mecanismos enzimáticos que involucran la sobreexpresión de MRP (del inglés *Multidrug Resistance Protein*) y el sistema de la topoisomerasa II. De todos estos mecanismos relacionados con resistencia a fármacos el más ampliamente estudiado es el MDR clásico, del cual se ha identificado dos genes en humanos [4], el *m:mdr1* y el *mdr3*, que codifican para diferentes proteínas, sin embargo aunque los genes son homólogos sólo *mdr1* parece relacionarse con la resistencia múltiple a fármacos.

### Resistencia Múltiple a Fármacos

El fenotipo clásico de MDR se relaciona con la expresión del gen *mdr1*, localizado en el brazo largo del cromosoma 7 [5], cuya secuencia de bases codifica la Glicoproteína-P, una glicoproteína constituida por 1280 aminoácidos con un peso molecular de 170kD, componente de la membrana citoplasmática que pertenece a la superfamilia de las proteínas ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*) [6]. La Glicoproteína-P (Gp-P) funciona como una bomba de transporte activo transmembrana que mediante la formación de un canal expulsa de la célula drogas lipofílicas [5, 7, 8, 3]. Se estima que aproximadamente el 30% de los fármacos son substratos potenciales de la Gp-P [2]. Entre los fármacos antineoplásicos que han sido vinculados con el efecto de flujo celular y resistencia al tratamiento mediante la Gp-P y *mdr1* se encuentran adriamicina, daunorrubicina, vincristina, vinblastina, etopósido, taxol, actinomicina D, mitomicina, mitoxantrona y trimetrexate [9], entre otros.

### Expresión del Gen MDR1

Se ha logrado la detección de la expresión del gen *mdr-1* en muchos tejidos humanos, ya sea directamente o indirectamente a través de su producto la glicoproteína P [10]. Entre éstos se encuentran órganos que tienen función excretora como el riñón, el colon y el hígado, así como barreras hemato-tisulares como la barrera hematoencefálica, el endometrio, el útero grávido y la glándula adrenal [4, 6]. Mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos

monoclonales se logró la detección de Gp-P en la superficie canalicular de los hepatocitos que conforman los conductos biliares, en la superficie apical del epitelio columnar del yeyuno y del colon, en la superficie apical de las células epiteliales de los túbulos proximales renales, en la superficie apical de los conductillos pancreáticos y en la corteza y la médula adrenales. Por otro lado, con el empleo de esta misma técnica de inmunohistoquímica no se logró detectar la expresión de la Gp-P en células de pulmón, gastrointestinales, glándulas salivales, corteza cerebral, cerebelo, médula espinal, ovario, piel, bazo y placenta [11]. Estos hallazgos parecen indicar que la Gp-P tiene un papel importante en la protección del organismo en contra del efecto de toxinas, sin embargo hasta el momento el conocimiento de la fisiología de la Gp-P es limitado.

Se han detectado niveles elevados de expresión del gen *mdr1* principalmente en células neoplásicas que tienen su origen en tejidos que normalmente expresan la Gp-P, lo que ha permitido la correlación de quimiorresistencia con algunos tipos de neoplasias malignas [4]. En el metanálisis realizado por Leighton y Goldstein [12] se evaluaron los reportes de estudios que relacionan la expresión elevada de la Gp-P con la respuesta a la quimioterapia en tumores sólidos de adultos, encontrando uniformidad en el reporte de una relación inversamente proporcional en los casos de cáncer de mama, de pulmón, cervico-uterino, de ovario y carcinomas gastrointestinales. Por otro lado mencionan que es más importante la determinación de la Gp-P en diferentes momentos del tratamiento antineoplásico que la técnica empleada para la determinación de la expresión de la Gp-P. Este estudio contrasta con el trabajo de Nooter y Herweijer [13] en el cual dividieron los estudios analizados en tres grupos según el grado de expresión del gen *mdr1*: el grupo uno lo conformaron aquellos reportes que describían la expresión elevada del *mdr1* con alta frecuencia de presentación, en el cual incluyeron los reportes de casos de carcinomas renales, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer adrenocortical, feocromocitoma y cáncer pancreático. El grupo dos lo conformaron los reportes con expresión intermedia del *mdr1* o baja frecuencia de presentación, en este incluyeron los reportes de sarcomas de tejidos blandos, neuroblastoma y cáncer de mama. En el grupo tres se incluyeron los reportes con niveles de expresión del *mdr1* bajos o casi siempre no detectables, mencionando casos de cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, tumor de Wilms, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar y cáncer de pulmón. En este trabajo el análisis demostró que las controversias que presentaban los reportes analizados en relación al nivel de expresión del *mdr1* fueron debidas a las diferencias metodológicas entre ellos, especialmente las debidas a la sensibilidad de la prueba que fue utilizada para la medición de la expresión del *mdr1* y que implicaba dificultades en el análisis.

Chan y colaboradores [14] midieron el nivel de Gp-P en 67 niños con neuroblastoma mediante inmunohistoquímica, detectando la presencia de Gp-P en 1 de 17 pacientes con estadio III (6%) y en 12 de 19 pacientes con estadio IV (63%), en comparación con la ausencia de Gp-P en los pacientes de estadios I, II y IVS. Los pacientes en los que no lograron detectar la Gp-P presentaron respuesta completa al tratamiento primario, mayor sobrevida libre de enfermedad y mayor sobrevida global en comparación con el grupo en el que se logró detectar la expresión de la Gp-P de manera estadísticamente significativa.



Kanavera y colaboradores [15] reportan un estudio prospectivo de 103 niños con leucemia aguda linfoblástica (LAL) de reciente diagnóstico en los cuales se determinó la expresión de la Gp-P utilizando citometría de flujo con anticuerpos monoclonales JSB1. Refieren en sus resultados que en el 53% de los pacientes se detectó la expresión elevada de Gp-P, aún y cuando el análisis estadístico no encontró diferencias significativas en la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global entre los grupos con expresión elevada de Gp-P y sin expresión de Gp-P. Reportan como asociación significativa la detección de niveles elevados de Gp-P en los pacientes con LAL de células T, pero sin relación con la cuenta leucocitaria, la edad, el género o el estudio citogenético.

### Rabdomiosarcomas en Pediatría

Los rabdomiosarcomas (RMS) son los sarcomas de tejidos blandos más frecuentes en la edad pediátrica, con los esquemas de tratamiento actuales se ha reportado una tasa de curación cercana al 60% [16]. En el Instituto Nacional de Pediatría ocupa el noveno lugar en frecuencia de neoplasias malignas pediátricas con el 3% de éstas (44). En el estudio de Chan y colaboradores [17], donde comparan los resultados de tratamiento de sus pacientes con los reportados por el IRS (Intergroup Rhabdomyosarcoma Study) reportan una sobrevida global a 5 años entre el 81 y el 100% en el grupo de pacientes estadiado en el grupo I, para el grupo II la sobrevida se reporta entre el 67 y el 80%, para los pacientes del grupo III se calculó entre 52% y 71%, en el grupo IV del 21 al 27%. Por otro lado, se ha reportado que aproximadamente el 40% de los pacientes con enfermedad recurrente responden pobremente al tratamiento intensivo [16]. Chan y colaboradores reportan un RR de 1.25 para la positividad de la glicoproteína P en relación a la sobrevida global con el 25% de sobrevida global a 5 años para los que presentaron positividad para GP-P y de 80% para los que presentaron la prueba negativa [17]. En otro estudio, Levine y colaboradores mediante un análisis multivariado en pacientes adultos con sarcomas determinaron el peso de predicción de diversos factores tales como la expresión de GP-P por inmunohistoquímica, el estadio, el análisis de DNA y la tinción de Ki-67 (marcador de proliferación celular) obteniendo un riesgo relativo para GP-P de 7.9.

En este estudio la expresión de *mdr-1* medida por RT-PCR no fue incluida en el análisis multivariado ya que no mostró significancia estadística en el análisis bivariado ni en el ajuste por el estadio [1, 16]. En el estudio de Kuttesch y colaboradores se analizó la expresión de GP-P detectada por inmunohistoquímica, resultando similar entre los tres marcadores utilizados con un RR de 2.3 en relación al periodo libre de enfermedad. Jimenez y colaboradores analizaron la expresión de *mdr-1*, detectada por inmunohistoquímica, en pacientes adultos con sarcomas de partes blandas de alto grado de malignidad en relación con el porcentaje de necrosis, que consideraron como la respuesta al tratamiento, dividiéndole en tres grados (buena, moderada y pobre respuesta) pero solo se menciona que los resultados mostraron únicamente mayor incidencia de la expresión aumentada de *mdr-1* en los tumores que tuvieron una respuesta pobre, en comparación con la menor incidencia de expresión de *mdr-1* en los pacientes con pobre respuesta. Por otro lado, Plaat y colaboradores analizaron la



expresión de *mdr-1* por inmunohistoquímica en pacientes adultos con sarcomas de tejidos blandos no rabdos, obteniendo como resultado una sobrevida global de 26 meses para el grupo de pacientes con inmunohistoquímica positiva y 51 meses para el grupo con inmunohistoquímica negativa, con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) [18]. En el trabajo de Stein se comparó la frecuencia de expresión de *mdr-1* detectada por inmunohistoquímica y por Northern Blot con el grado de malignidad de sarcomas óseos y de partes blandas en adultos. Los resultados mostraron una mayor frecuencia de expresión de *mdr-1* en aquellos tumores considerados como malignos (del 66% al 90% con media de 72% en pacientes con sarcomas óseos y del 50% al 100% con media de 66% en los pacientes con sarcomas de partes blandas), pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en el análisis de sobrevida entre los pacientes con expresión positiva y negativa ( $P > 0.05$ ) [19].

Por otro lado, Dumontet y colaboradores detectaron la expresión de *mdr-1* por RT-PCR en tan sólo 4 de 9 pacientes (44%) sobrevivientes con sarcomas de partes blandas como parte de un estudio de resistencia específica al Paclitaxel [20].

Hasta el momento aun existe controversia del significado de la relación entre la expresión de Gp-P, especialmente la detectada por RT-PCR, y el desarrollo de resistencia a la quimioterapia en los pacientes pediátricos con RMS [TABLA 1] [16 a 21].

## Osteosarcomas en Pediatría

Los tumores óseos malignos ocupan el 5% de todas las neoplasias sólidas en pacientes pediátricos, de éstos el osteosarcoma es el más común. En el Instituto Nacional de Pediatría ocupa el primer lugar en frecuencia de todas las neoplasias malignas primarias de hueso. En el caso de los pacientes pediátricos con Osteosarcoma (OSM) no se ha logrado determinar con precisión los factores de riesgo relacionados con recaída más que la presencia de metástasis evidentes al momento del diagnóstico, ya que factores como el tamaño del tumor primario y el grado de diferenciación celular no han demostrado una asociación estadística consistente con la sobrevida en diversos estudios ( $P = 0.57$ ) [22, 23]. Por otro lado, se ha reportado recaída hasta en el 90% de los pacientes con OSM metastásico y del 20 al 40% de los pacientes con OSM no metastásico [22], aún con el empleo de esquemas de quimioterapia actuales. En el análisis de la relación de la expresión de la Gp-P y el desarrollo de resistencia a la quimioterapia también existe disparidad entre los diversos estudios que comentan al respecto [TABLA 2]. En el estudio de Chan y colaboradores se buscó la relación pronóstica de la sobrevida global y de la tasa de recaídas con diversos factores al diagnóstico como el tamaño tumoral (tomando como punto de corte 10cm), el grado de diferenciación, la presencia de metástasis al diagnóstico y la expresión de *mdr-1* detectada por inmunohistoquímica, resultando el tamaño tumoral, la presencia de metástasis y la expresión de *mdr-1* estadísticamente significativos para recaída ( $P = 0.043$ ,  $0.00004$  y  $< 0.00001$ , respectivamente), pero esta significancia se perdía en el análisis estratificado por la expresión de *mdr-1* en el tamaño tumoral y el grado de diferenciación, persistiendo solamente en el caso de metástasis al diagnóstico

( $P= 0.33, 0.71, 0.077$ ). De igual forma, en el análisis de sobrevida sólo mostraron significancia estadística la presencia de metástasis y la expresión de mdr-1 (OR 0.87 para metástasis negativa y de 4.4 para metástasis positiva con  $P= 0.024$ , OR 0.21 para expresión de mdr-1 negativa y de 2.30 para mdr-1 positiva con  $P < 0.00001$ ) [22].

Scotlandi y colaboradores compararon en líneas celulares de osteosarcoma humano con resistencia conocida a Adriamicina (línea celular U-2 OS) la expresión de mdr-1 con la agresividad del tumor en base a la capacidad de metástasis y con el grado de resistencia in vitro, resultando una asociación significativa solo la expresión de mdr-1 con el grado de resistencia in vitro. También reportan el análisis de asociación de pacientes con recaída y expresión de mdr-1, resultando significativa dicha asociación con expresión de mdr-1 en el 57% de los pacientes con recaída contra 20% que no expresaban mdr-1), sin embargo en el análisis del tiempo de aparición de las metástasis reportó que es más largo en los pacientes con expresión de mdr-1 en comparación con aquellos que no expresan mdr-1 ( $32.6 \pm 3.3$  y  $15.3 \pm 2.5$  respectivamente con  $P < 0.001$ ) [23]. Baldini y colaboradores De la misma forma que Duensing) buscaron la asociación pronóstica de la expresión de mdr-1 detectada por inmunohistoquímica para la posibilidad de recaída en pacientes con osteosarcoma, utilizando un análisis de regresión de Cox obtuvieron un riesgo de 3.37 con IC 95% de 1.6 a 7.10 ( $P=0.001$ ) [24, 25]. Shnyder en un reporte preliminar refiere la comparación de la expresión de mdr-1 detectado por inmunohistoquímica antes y después del tratamiento primario notando una disminución en el porcentaje de detección de positividad a la tinción pero sin comparar dicho hallazgo con la respuesta al tratamiento o la sobrevida [26].

En contraparte, Kandel y colaboradores, como un objetivo secundario del estudio, analizaron la asociación entre la expresión de mdr-1 medida por RT-PCR y por inmunohistoquímica y la respuesta al tratamiento en pacientes con osteosarcoma sin encontrar alguna asociación significativamente estadística, pero este estudio se diseñó para comparar las utilidades diagnósticas de RT-PCR e inmunohistoquímica para la detección de la expresión de mdr-1 [27]. Shnyder y colaboradores analizaron la sobrevida de pacientes con osteosarcoma en relación a la expresión de mdr-1 detectada por inmunohistoquímica utilizando dos marcadores diferentes, sin encontrar diferencias significativas en la tasa de sobrevida entre los que expresaban mdr-1 y los que no ( $P= 0.81$  y  $0.88$  para cada marcador) [28]. En un modelo animal de osteosarcoma, Takeshita y colaboradores analizaron la correlación que existe entre la línea celular de osteosarcoma y la agresividad de la misma (definida como la velocidad de replicación in vivo y la capacidad de producir metástasis) en relación a la expresión de mdr-1 detectado por inmunohistoquímica y por PCR. No encontraron una asociación estadísticamente significativa, sin embargo este estudio tiene un tamaño muestral pequeño [29].

## Sarcomas de Ewing en Pediatría

Perri y colaboradores estudiaron 75 pacientes con Sarcoma de Ewing (SE) o tumor neuroectodérmico primitivo periférico [30], a 53 de ellos se les realizó inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales JSB1 antes de iniciar el tratamiento

antineoplásico, de los cuales 34 (64%) dieron positiva la prueba. La sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global resultó de 59% en los pacientes con inmunohistoquímica negativa y de 41% en los pacientes con la prueba positiva, sin diferencias estadísticamente significativas.

#### Detección de la Expresión del Gen MDR1

Los estudios publicados hasta el momento han estudiado la expresión de la Gp-P utilizando diversas técnicas y en diferentes tiempos del tratamiento de los pacientes con cancer. Algunos estudios refieren sensibilidad y especificidad entre 90 y 99% para la inmunohistoquímica de manera aislada, cifra que disminuye hasta menos de 30% cuando es comparada con otras pruebas de análisis de DNA y RNA como PCR y RT-PCR, una vez que se han tomando en cuenta las limitaciones técnicas propias de cada metodología. [31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38]. En un primer trabajo de revisión, Chan y colaboradores [34] analizaron las características de 4 técnicas diferentes de análisis de la expresión de la Gp-P, ensayos de determinación de RNA y mRNA, inmunoblot, inmunohistoquímica y ensayos funcionales. Describen que los ensayos con RNA y mRNA presentan como desventajas la pérdida potencial de una pequeña cantidad de células positivas en una muestra predominantemente negativa, la incapacidad para distinguir entre células normales y células neoplásicas, la imposibilidad de evaluar directamente la expresión de la Gp-P, comúnmente requieren muestras grandes y no se puede utilizar tejido fijado en parafina, pero las ventajas de ser una prueba cuantitativa y objetiva. El análisis por inmunoblot tiene las desventajas de que también pueden perderse una pequeña cantidad de células positivas, no distingue entre células neoplásicas y células normales, requiere gran cantidad de muestra para analizar y no pueden utilizarse muestras previamente fijadas, pero con las ventajas de que permite un análisis directo de la Gp-P, es una prueba objetiva y cuantitativa. En cambio las pruebas de inmunohistoquímica presentan como desventajas que son pruebas semicuantitativas y subjetivas, con las ventajas de que analiza directamente a la Gp-P, logra distinguir entre células neoplásicas y células normales, requiere de muestras pequeñas para su análisis y pueden utilizarse muestras previamente fijadas. Las pruebas funcionales son ensayos que evalúan la función de la Gp-P mediante la medición del flujo de fármacos. En un estudio posterior, Beck y colaboradores [3] intentaron la unificación de los criterios para la determinación de Gp-P y *mdr1*, en base a un muestreo multicéntrico que fue analizado mediante 4 técnicas: detección de Gp-P por inmunohistoquímica, detección de la expresión de Gp-P por citometría de flujo, medición de la función de la Gp-P y rt-PCR. Reportando las siguientes consideraciones en base a los resultados obtenidos: 1) La detección de Gp-P por inmunohistoquímica presenta ventajas intrínsecas en la detección de la expresión de la Gp-P en leucemias y en tumores sólidos y permite el análisis de muestras en parafina o congeladas, pero con la desventaja de la subjetividad. Recomiendan emplear por lo menos dos anticuerpos monoclonales que reconozcan diferentes epitope, como por ejemplo uno citoplasmático y otro de la superficie de la membrana; el reporte de este tipo de ensayos deberá ser con la siguiente escala: negativo (-), bajo (+), intermedio (++) , alto (+++) o muy alto (++++). 2) De la detección de la expresión de Gp-P por

citometría de flujo menciona que el análisis de muestras de tumores sólidos pueden presentar problemas y que deben utilizarse muestras de tejido fresco. 3) En relación a las pruebas de medición de la función de la Gp-P recomiendan el empleo de fármacos y de otros marcadores comerciales de manera paralela. 4) El análisis de la Gp-P por rt-PCR lo refieren como el de mayor sensibilidad y especificidad con la desventaja de que no diferencia qué tipo de células (neoplásicas o normales) expresan el gene por lo que es indispensable que todas las muestras procesadas sean acompañadas de la determinación del contenido de células tumorales para el análisis de cada muestra, así mismo recomiendan el uso de controles internos que garanticen alta calidad de RNA para la amplificación utilizando B-2 microglobulina o histona 3.3.

Noonan y colaboradores demostraron la capacidad de la técnica de PCR para detectar niveles bajos de expresión de *mdr1* en muestras que parecían ser negativas empleando otras técnicas [39]. Kandel reporta consistencia en la sensibilidad y especificidad en las diferentes técnicas de inmunohistoquímica, sin embargo éstas son menores cuando se comparan con RT-PCR que detectó la expresión de *mdr-1* en más del 60% de las muestras que resultaron negativas para inmunohistoquímica.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Podemos considerar a la expresión elevada del gen *mdr-1* como factor pronóstico adverso de la respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante en pacientes pediátricos con rhabdomyosarcomas, sarcomas de Ewing y osteosarcomas?

## JUSTIFICACION

En los pacientes pediátricos con sarcomas de partes blandas y óseos el desarrollo de resistencia a la quimioterapia es un factor importante de falla terapéutica.

Dentro de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia a drogas la sobre expresión del gen *mdr1* es el más comprendido, sin embargo la relación pronóstica que guarda con la respuesta de estas neoplasias a la quimioterapia no se ha determinado. Por esta razón es de suma importancia para el oncólogo pediatra conocer el papel de la detección de la expresión de este gen como factor pronóstico al inicio del tratamiento para la planeación de un esquema quimioterapéutico que sea adecuado a la biología de las células neoplásicas, además de permitir posteriormente la evaluación de fármacos que regulen este mecanismo de resistencia a la quimioterapia, incidiendo así en uno de los problemas más importantes relacionados con la falla terapéutica del tratamiento antineoplásico en niños con estas enfermedades.

## OBJETIVO

Determinar la importancia de la expresión del gen *mdr1* en células de rhabdomyosarcomas, sarcomas de Ewing y osteosarcomas de pacientes pediátricos como factor pronóstico adverso de la respuesta al tratamiento antineoplásico neoadyuvante.

## HIPOTESIS

La expresión elevada del gen *mdr1* en las células de rhabdomyosarcomas, sarcomas de Ewing y osteosarcomas en pacientes pediátricos es un factor pronóstico adverso para la respuesta al tratamiento antineoplásico neoadyuvante.

## DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, prolectivo, comparativo y transversal.

## MATERIAL Y METODOS

### Población Objetivo

Pacientes de cualquier género, menores de 18 años, con alguno de los siguientes diagnósticos: Rabdomiosarcoma, Osteosarcoma o Sarcoma de Ewing.

### Población Elegible

Pacientes que ingresen al Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, a partir de septiembre del 2002, que cumplan los criterios de inclusión enseguida descritos.

### Criterios de Inclusión.

Se incluirán en el estudio a pacientes de cualquier género, menores de 18 años, que ingresen al Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría con el diagnóstico histopatológico de Rabdomiosarcoma, Osteosarcoma o Sarcoma de Ewing (ver definiciones operacionales) que no hayan recibido algún esquema de quimioterapia previamente. Ingresarán al estudio sólo aquellos pacientes cuyo familiar responsable ante el Instituto Nacional de Pediatría (padre, madre u otro familiar que represente la tutoría del paciente) haya firmado la hoja de consentimiento de ingreso al protocolo de estudios. Los pacientes deberán contar con una muestra adecuada de tejido neoplásico (ver definiciones operacionales) antes de iniciar el tratamiento antineoplásico.

### Criterios de Exclusión.

Serán excluidos del estudio aquellos pacientes que no tengan una muestra de tejido adecuada antes de iniciar la quimioterapia. También serán excluidos los pacientes que no completen el tratamiento de neoadyuvancia.

### Criterios para la Estadificación.

En el caso de los pacientes con Rabdomiosarcoma (RMS), se utilizará para la estadificación los criterios propuestos por el IRS (International Rabdomyosarcoma Study): estadio I tumor localizado completamente resecado; estadio II tumor localizado resecado con enfermedad microscópica residual o tumor no localizado y completamente resecado; estadio III enfermedad residual macroscópica; estadio IV



metástasis a distancia) y se tomarán en cuenta los siguientes patrones histológicos: alveolar, embrionario, pleomórfico y anaplásico. En el caso de los pacientes con osteosarcoma la estadificación será en base a la presencia o ausencia de metástasis evidentes al diagnóstico. Para los pacientes con Sarcoma de Ewing (SE) se tomará como criterio de estadificación la presencia de neoplasia única, multicéntrica o metastásica así como su localización, sea axial o extraxial. Los pacientes recibirán el esquema de quimioterapia de acuerdo al estadio que presenten, según los protocolos de tratamiento del Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría (ver definiciones operacionales).

#### Cálculo del Tamaño Muestral.

El tamaño muestral mínimo recomendado para el análisis discriminante es de cinco observaciones por cada una de las variables independientes, incluyendo a aquellas que no logren ingresar a la función discriminante. Otra consideración es que el tamaño de cada grupo no debe ser menor al número de variables independientes.

Así, considerando variables independientes a: 1) Expresión de *mdr-1*, 2) Volumen tumoral, 3) Estadio, 4) Variedad histológica, y 5) Tipo de Tumor, el cálculo del tamaño muestral mínimo es de 25 pacientes. Dado que es un estudio transversal no se considera un porcentaje extra (comunmente del 20%) para ajustar las pérdidas por el seguimiento, ya que no existirá seguimiento de los casos.

#### Método.

De los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión se analizarán las muestras de tejido neoplásico fresco correspondientes al momento del diagnóstico. Dichas muestras de tejido serán conservadas en un contenedor con nitrógeno líquido a una temperatura de menos 70 grados centígrados hasta el momento de su análisis. Las muestras de tejido serán maceradas en un porador y sometidas a desnaturalización por medio de una técnica estandarizada con reactivos comerciales (TRIzol reagent, Gibco, USA). Se analizará RNA por técnica de RT-PCR para determinar la expresión del gen *MDR1*, partiendo de una cantidad de 5 µg de RNA total en un volumen de 20 µL. Mediante una enzima reverso transcriptasa específica se obtendrá la cadena complementaria de DNA (DNAc) que servirá de base para la PCR. Para la amplificación de la cadena de DNAc se utilizará un kit de reactivos y 1 U de Taq-polimerasa (Perkin-Elmer) para el DNAc derivado de 250ng de RNA, con un volumen final de 50µL. Para el análisis por PCR se utilizará un volumen final de 50 µL que contendrá un volumen de cDNA equivalente a 250 ng de RNA total. Para obtener la amplificación de las muestras se utilizarán sondas de oligonucleótidos específicos para *mdr1* con la siguiente secuencia con sentido 5'-CACGTGGTTGGAAGCTAACC-3' y la siguiente secuencia antisentido 5'-GAAGGCCAGAGCATAAGATGC-3' que resultará en un producto de 167 pares de bases; para la amplificación de la Beta-2 microglobulina se utilizarán sondas de oligonucleótidos con la siguiente secuencias 5'-GTGGAGCATTTCAGACTTGTCTTTCAGC-3' y 5'-



TTCACCTCAATCCAAATGCGGCATCTTC-3' que resultará en un producto de 120 pares de bases. Para la amplificación se utilizará un termociclador (modelo Perkin Elmer 9600) en el cual se llevarán a cabo los programas de desnaturalización, alineación y extensión de proteínas a diferentes temperaturas, bajo técnicas estandarizadas, para la desnaturalización, la alineación y la extensión utilizando el siguiente protocolo de acuerdo a la Mtde los oligonucleótidos utilizados:

- Para mdm1 se iniciará con desnaturalización inicial por 10 minutos a 95°C; 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C; alineación de los oligonucleótidos por 30 segundos a 57°C; polimerización por un minuto a 72°C y una extensión final por 10 minutos a 72°C.
- Para la  $\beta$ 2-microglobulina el protocolo inicia con desnaturalización por 10 minutos a 95°C; 35 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95°C; alineación de los oligonucleótidos por 30 segundos a 53°C; polimerización por un minuto a 72°C y una extensión final por 10 minutos a 72°C.

Los ciclos de extensión serán completados en aproximadamente 2 horas. Los productos de la amplificación serán separados por electroforesis en un gel de agarosa al 12% y serán teñidos con bromuro de etidio para ser autorradiografiados en un transiluminador (modelo Alphainnotech). Se tomarán en cuenta todas las recomendaciones necesarias para evitar la contaminación de las pruebas. Parte de la muestra de tejido que se utilizará para el ensayo de PCR será enviada al departamento de patología para realizar tinción con hematoxilina y eosina con el objetivo de cuantificar el porcentaje de células neoplásicas que contiene dicha muestra, para asegurar que la prueba se realice predominantemente con tejido neoplásico.

Se utilizará inmunohistoquímica para Glicoproteína-P en algunos pacientes como prueba de la expresión, buscando establecer una correlación entre ambas pruebas. Sin embargo es importante mencionar que éste no objetivo del estudio, sino que meramente servirá de referencia.

También será medido el volumen tumoral tanto del tumor primario como de las metastásis, en aquellos casos que se demuestren éstas últimas, utilizando un tomógrafo (modelo Toshiba TC 600 XT) para determinar el volumen tumoral en cm<sup>3</sup>.

Esta medición se realizará al diagnóstico y al finalizar el tratamiento de neoadyuvancia, antes de la cirugía de segunda vista con el fin de evaluar los cambios en el volumen tumoral.

#### Análisis Estadístico.

Se realizará una descripción de las variables con estadística descriptiva. Para las variables cualitativas ordinales y nominales se obtendrán proporciones en cada rango de respuesta y para las variables numéricas se determinará su distribución, en aquellas variables con distribución normal se realizará medias más o menos desviación estándar y en aquellas con distribución sesgada se obtendrá la mediana, con valores mínimos y máximos. Se buscará establecer la relación pronóstica entre la variable dependiente y la independiente a través de  $X^2$ , t o U MANN WHITNEY, dependiendo del tipo de variable y la distribución que adopten los datos. Se realizará un análisis

discriminante múltiple de las variables de interés ya mencionados, para conocer la relación pronóstica de la expresión del gen *mdr1* de manera aislada y también de manera conjunta con los factores predictivos ya conocidos para determinar el peso específico de la expresión del gen *mdr1* como factor pronóstico. Se verificará la significancia estadística de la capacidad discriminatoria del modelo de función discriminante mediante la lambda de Wilks, la traza de Hotelling y el criterio de Pillai.

El ajuste global de las funciones discriminantes consideradas será evaluado con el cálculo de la puntuación Z discriminante para cada observación. La evaluación de las diferencias de cada grupo sobre las puntuaciones Z discriminantes y la valoración de la precisión será utilizada para predecir la pertenencia al grupo.

## RESULTADOS

Antes de iniciar la recolección de muestras, el proyecto de investigación fue aceptado por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Para la realización del estudio piloto se reunió una muestra de seis pacientes, que corresponde al 24% de la muestra mínima estimada.

### Pacientes y Muestras de Tejido.

Todas las muestras de tejido neoplásico fueron obtenidas durante el procedimiento de biopsia excisional en el quirófano y corresponden a tejido adyacente al tejido que se tomó como parámetro para el diagnóstico histopatológico. En todos los casos, el procedimiento de biopsia se realizó antes de iniciar con el esquema de tratamiento antineoplásico. Las muestras fueron almacenadas en tubos ependorf con 2mL de solución RNA-Later®. El tamaño de las muestras fue aproximado de 0.5cm de diámetro, con el objetivo de que el tejido rebozara en la solución RNA-Later®. El tiempo transcurrido desde la extracción del tejido hasta la colocación en el ultracongelador (para mantener las muestras a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) no fue mayor a 20 minutos para las seis muestras. De los 6 pacientes, cuatro correspondieron al género masculino y dos al género femenino. La edad promedio fue de 81.7 meses, la mediana de 83 con una desviación estándar (DS) de 58 meses y el intervalo de 166 (valores mínimo y máximo de 14 y 180, respectivamente). En la mitad de los pacientes (3 casos) el diagnóstico fue rhabdomioma y en la otra mitad sarcoma de Ewing (figura 1, anexo IV). No se registró algún paciente con diagnóstico de osteosarcoma. El diagnóstico se estableció en todos los casos utilizando los criterios histopatológicos mencionados en las definiciones operacionales. Para asegurar la comparabilidad de las muestras, en el servicio de patología se realizó la determinación del porcentaje de células neoplásicas malignas en el corte adyacente a la muestra neoplásica que sería sometida al estudio de RT-PCR, en todos los casos este porcentaje fue mayor al 90% (figura 1, anexo IV). La estadificación se estableció en base a los criterios histológico y anatómico, es decir que se tomó en cuenta el patrón histológico y el sitio anatómico del tumor primario. En cinco casos la histología resultó desfavorable (83.3%) y en uno resultó favorable (16.7%). Se registró el sitio del tumor primario como favorable en 3 pacientes, mientras que en los otros 3 el sitio fue desfavorable (ver definiciones operacionales). Todos los casos correspondieron a estadios avanzados, siendo dos de ellos estadio III y los cuatro restantes estadio IV. El volumen tumoral se determinó en el servicio de radiología. El volumen tumoral inicial se obtuvo del estudio de tomografía axial computada al momento del diagnóstico, es decir antes de iniciar el tratamiento de neoadyuvancia. El promedio del volumen tumoral inicial resultó en  $1892\text{cm}^3$ , la mediana de  $1275\text{cm}^3$  con una DS de  $1842\text{cm}^3$ , un intervalo de  $4300\text{cm}^3$  (con valores mínimo y máximo de  $200\text{cm}^3$  y  $4500\text{cm}^3$ , respectivamente). En el caso del volumen tumoral final, el promedio fue de  $803\text{cm}^3$ , la mediana de  $207\text{cm}^3$  con una DS  $1376\text{cm}^3$ , un intervalo de  $3500\text{cm}^3$  (valores mínimo y máximo de 0 y  $3500\text{cm}^3$ , respectivamente). Para el porcentaje de necrosis el promedio fue de 55%, la mediana

de % con una DS de 44.9%, un intervalo de 95% (valores mínimo y máximo de 5 y 100% respectivamente). Tras completar el tratamiento, se registraron 3 casos sin respuesta (50%), un caso con respuesta parcial (16.7%) y dos casos con respuesta completa (33.3%). El resumen de los datos se encuentra en la tabla 6 (anexo IV).

#### Extracción de RNA y Análisis RT-PCR

Posterior al procedimiento de maceración, las muestras de tejido neoplásico fueron sometidas al proceso de desnaturalización con el reactivo de TRIzol (Gibco, USA). Para la realización de la técnica de RT-PCR se partió de una cantidad aproximada de 5µg de RNA total, que fue cuantificada y posteriormente aforada a un volumen de 20 µL en solución buffer. Para obtener la cadena complementaria de DNA (cDNA), que serviría de base para la prueba de PCR, se utilizó 1U de Taq-polimerasa (Perkin-Elmer).

Para el análisis de PCR se utilizó cDNA equivalente a 250ng de RNA, aforado a un volumen final de 50 µL. La amplificación de las muestras se llevó a cabo empleando las sondas de oligonucleótidos específicos para *mdr1* con la siguiente secuencia con sentido 5'-CACGTGGTTGGAAGCTAACC-3' y la siguiente secuencia antisentido 5'-GAAGGCCAGAGCATAAGATGC-3'. Con lo que se obtuvo un producto con una longitud de 167 pares de bases. Se tomo como control positivo a la β2-microglobulina. El proceso de PCR se realizó en un termociclador con los siguientes protocolos:

#### PROTOCOLO PCR PARA MDR1

PROCESO	TIEMPO	TEMPERATURA
Desnaturalización Inicial	10 minutos	95°C
Desnaturalización*	30 segundos	94°C
Alineación*	30 segundos	57°C
Polimerización*	60 segundos	72°C
Extensión Final	10 minutos	72°C

\* se repiten por 30 ciclos antes de iniciar el último proceso.

#### PROTOCOLO PCR PARA β2-MICROGLOBULINA

PROCESO	TIEMPO	TEMPERATURA
Desnaturalización Inicial	10 minutos	95°C
Desnaturalización*	30 segundos	95°C
Alineación*	30 segundos	53°C
Polimerización*	60 segundos	72°C
Extensión Final	10 minutos	72°C

\* se repiten por 35 ciclos antes de iniciar el último proceso.

El resultado de la determinación de la expresión de *mdr1* fue 4 casos sin expresión, que corresponde al 66.7%, y dos con expresión, correspondiente al 33.3%. El control de β2-microglobulina fue adecuado en todos los casos (ver figura 2, anexo IV).

#### Análisis Estadístico.

El resumen de los datos incluidos en el análisis estadístico se encuentra en la tabla 6 (ver anexo IV). El análisis bivariado resultó no significativo en todos los casos debido a que el total de las casillas de la prueba de Chi-Cuadrada tuvieron valores menores a 5, hecho que condiciona un nivel de significancia mínimo o basal de 0.25 . Esta condición era esperada por el número muestral reducido para este estudio piloto. En el análisis de función discriminante, el ajuste del modelo resultó no significativo (significancia = 0.276), aunque de nuevo se debe tomar en consideración el tamaño muestral reducido antes de realizar alguna conjetura (tabla 7, ver anexo IV).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio piloto podemos establecer la factibilidad del estudio en relación al diseño y la metodología planteados, tomando en consideración los siguientes puntos :

1. La toma y almacenamiento del tejido que será utilizado en el estudio de expresión, por el método de RT-PCR, deberá apegarse estrictamente al protocolo, para evitar lo más posible que dicho tejido sufra algún daño y el RNA sea degradado, lo que excluye del estudio a ese caso particular. Esta problemática fue la más importante durante la realización del estudio piloto y motivó a la exclusión de algunos pacientes. Por lo tanto, la supervisión del procedimiento de toma y almacenamiento de la muestra de tejido neoplásico por parte del investigador es esencial.
2. Para la captura de un número mayor de pacientes se deberea considerar a otros centros de atención oncológica pediátrica en la zona metropolitana, para permitir así un control estrecho principalmente el el procedimiento de toma y almacenamiento de la muestra de tejido neoplásico.
3. El registro de los datos es también una parte importante, ya que para el análisis estadístico que se plantea una condición ideal es que no se tengan datos perdidos. Se deberá plantear para el análisis bivariado el empleo exclusivo de la prueba exacta de Fisher en los análisis pertinentes. Aunque esta prueba es mas robusta y exigente en comparación a otras pruebas de Chi-Cuadrada, la prueba exacta de Fisher puede realizarse aún con valores menores de 5 en sus casillas, hecho que puede llegar a presentarse dado el tamaño muestral mínimo calculado.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### DEFINICIONES OPERACIONALES

Tipo de neoplasia (variable categórica politómica):

A) Rbdomiosarcoma: tumor maligno originado de células mesenquimales con un linaje de músculo esquelético.

B) Osteosarcoma: tumor maligno originado de células mesenquimales con un linaje de tejido óseo con diferenciación osteoblástica o condroblástica predominantemente.

C) Sarcoma de Ewing: tumor maligno conformado por células pequeñas, redondas y azurófilas, con presencia de agregados celulares separados por amplias bandas de tejido fibroso, con pobre diferenciación neuroectodérmica y negativos para las tinciones de inmunohistoquímica para marcadores neurales.

Esquema de quimioterapia para Rbdomiosarcoma:

I)Estadio I:

- 1.Vincristina 1.5mgm<sup>2</sup> por 12 dosis semanales
- 2.Actinomicina D 15mcg por Kg por 5 dosis diarias las semanas 0, 6 y 12

II)Estadio II:

- 1.Vincristina 1.5mgm<sup>2</sup> por 12 dosis semanales
- 2.Actinomicina D 15mcg por Kg por 5 dosis diarias las semanas 0, 6 y 12
- 3.Ciclofosfamida 10mg por Kg por 3 dosis diarias de las semanas 0, 6 y 12

III)Estadios III y IV:

- 1.Vincristina 1.5mgm<sup>2</sup> por 12 dosis semanales
- 2.Actinomicina D 15mcg por Kg por 5 dosis diarias las semanas 0, 3, 6 y 12
- 3.Ifosfamida 3g:m<sup>2</sup> por tres dosis diarias las semanas 0, 3, 6 y 12

\*Al terminar los cursos planeados pasará a cirugía

Esquema de quimioterapia para Osteosarcoma.

I)OSM no Metastásicos:

- |                       |  |
|-----------------------|--|
| Semanas 1, 5, 9 y 13: | 1.Cisplatino 120mgm <sup>2</sup> por una dosis           |
|                       | 2.Adriamicina: 30mgm <sup>2</sup> por tres dosis diarias |
| Semanas 3, 7 y 11:    | 1.Cisplatino 120mgm <sup>2</sup> por una dosis           |
| Semana 15: cirugía    |  |

II)OSM Metastásicos:

- |                    |  |
|--------------------|--|
| Semanas 0 y 6:     | 1.Cisplatino 60mgm <sup>2</sup> por dos dosis diarias  |
|                    | 2.Adriamicina 45mgm <sup>2</sup> por dos dosis diarias |
| Semanas 3 y 9      | 1.Ifosfamida 2.7gm <sup>2</sup> por 5 dosis diarias    |
| Semana 12: cirugía |  |



Esquema de quimioterapia para Sarcoma de Ewing:

I) No metastásico, no multicéntrico, axial o extraxial:

1. Ciclofosfamida 150mgm<sup>2</sup> por 7 dosis diarias de las semanas 0 y 6
2. Cisplatino 100mgm<sup>2</sup> por una dosis de las semanas 3 y 9
3. Adriamicina 35mgm<sup>2</sup> por una dosis de las semanas 0, 3, 6 y 9

II) Metastásico, multicéntrico:

1. Ifosfamida 3gm<sup>2</sup> por tres dosis diarias de las semanas 0, 3, 6 y 9
2. Vincristina 1.5mgm<sup>2</sup> por semana por 12 semanas
3. Adriamicina 30mgm<sup>2</sup> por dos dosis diarias de las semanas 1 y 6
4. Actinomicina D 0.5mgm<sup>2</sup> por tres dosis diarias de las semanas 3 y 9

**METASTASIS:** presencia o evidencia de la neoplasia en estudio en otro sitio anatómico diferente al referido como localización de la neoplasia primaria.

**NEOADYUVANCIA:** El tratamiento con quimioterapia que se administra antes de la cirugía o radioterapia definitivas.

**RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE NEOADYUVANCIA:** esta será dividida en tres grupos (Variable categórica politómica).

- I) Buena Respuesta: necrosis tumoral de más del 90%, disminución del 50% o más del volumen tumoral inicial y desaparición de las metástasis después de la neoadyuvancia.
- II) Respuesta Parcial: necrosis tumoral entre el 60% y el 89%, disminución menor del 50% del volumen del tumor primario o las metástasis, después de la neoadyuvancia.
- III) Sin Respuesta: necrosis tumoral menor del 60%, sin cambios o con aumento en el volumen tumoral o persistencia o aparición de nuevas lesiones metastásicas.

**EXPRESION DE MDR1:** será clasificada en dos grupos en base a los estudios de PCR y RT-PCR. (Variable categórica dicotómica)

- A) Positivo para la expresión de mdr1: muestras que presenten bandas específicas de 167 pb, correspondiente a mdr1 en la autorradiografía y bandas específicas para Beta-2 microglobulina con tamaño de 120 pb, ambas corroboradas con un marcador de peso molecular.
- B) Negativo para la expresión de mdr1: muestras que no presenten bandas específicas de 167 pb en la autorradiografía pero que presenten bandas específicas para Beta-2 microglobulina con tamaño de 120 pb corroboradas con un marcador de peso molecular.

**MUESTRA DE TEJIDO ADECUADA PARA ANALISIS:** aquella de la cual se obtenga RNA y DNA en cantidad mayor de 500ng, en el momento del diagnóstico.

VOLUMEN TUMORAL I (inicial): será definido como la medida en centímetros cúbicos de la neoplasia primaria antes de iniciar la quimioterapia de neoadyuvancia, utilizando como instrumento de medición la tomografía computada (variable numérica continua).

VOLUMEN TUMORAL II (después de la neoadyuvancia): será definido como la medida en centímetros cúbicos de la neoplasia primaria al término de la quimioterapia de neoadyuvancia, utilizando como instrumento de medición la tomografía computada (variable numérica continua).

NECROSIS TUMORAL: será definida como el porcentaje de células de la segunda muestra (de segunda vista o después de la neoadyuvancia) que presenten cambios histopatológicos compatibles con muerte celular (variable numérica continua).

## ANEXO II

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO TITULADO: "Expresión de mdr1/glicoproteína P en sarcomas pediátricos como factor pronóstico de la respuesta temprana al tratamiento con quimioterapia."

### I. INTRODUCCIÓN

Es importante que lea y comprenda la siguiente explicación a cerca de la enfermedad de mi hijo y la posibilidad de que sea incluido en el estudio que arriba se menciona, esta explicación describe claramente el propósito, beneficios y riesgos que condiciona el ingreso de mi hijo al estudio. También es importante que entienda que el hecho de no aceptar la participación de mi hijo(a) en este estudio no influirá en las decisiones de tratamiento médico de su enfermedad.

### II. OBJETIVO

Yo (paciente o padre o tutor) \_\_\_\_\_  
con dirección en \_\_\_\_\_

Voluntariamente acepto para que yo y mi hijo (nombre del paciente) \_\_\_\_\_

participemos en el estudio, cuyo propósito es determinar que utilidad tiene la detección de la expresión de un gen para la respuesta al tratamiento neoadyuvante con quimioterapia antineoplásica. Por la enfermedad que tiene mi hijo (a) \_\_\_\_\_, se le considera como un candidato para ingresar al estudio.

### III. PROCEDIMIENTOS

Mi hijo (a) será sometido a una biopsia de la lesión neoplásica maligna, de la cual tomaremos parte del tumor, en el mismo procedimiento de cirugía que se obtenga la muestra para hacer el diagnóstico del tipo de cáncer que se trate. Dicha muestra será analizada con técnicas de laboratorio para determinar la expresión de un gen específico.

### IV. BENEFICIOS

Comprendo que no existe ningún beneficio directo para mi hijo(a). En el futuro el conocimiento del papel que tiene la expresión de este gen será de utilidad para el tratamiento de otros niños con tumores semejantes al de mi hijo (a).

### V. RIESGOS

Mi hijo(a) no será sometido a ningún riesgo extra más que el propio de la biopsia que es necesaria para el diagnóstico del tipo de cáncer que tiene. Estoy informado de las pruebas de laboratorio que se realizarán a la muestra del tumor y que no implican riesgos o efectos indeseables en mi hijo(a).

#### VI.ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si yo decido no participar en el estudio, el diagnóstico, tratamiento y seguimiento serán iguales que en otros pacientes tratados en este Instituto Nacional de Pediatría por neoplasias malignas semejantes.

#### VII.CONFIDENCIALIDAD

Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre ni el de mi hijo(a) serán mencionados en el reporte del estudio.

#### VIII.DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION

La información del resultado de las pruebas de laboratorio que se realicen a la muestra del tumor sólo se me notificarán al finalizar el estudio, pero el resultado de las otras pruebas diagnósticas me será notificado inmediatamente en cuanto se tenga disponible dicho reporte por parte del personal encargado de realizar dichos estudios en el Instituto Nacional de Pediatría.

#### IX.CESION DE DERECHOS

La decisión de ingresar al estudio implica que la muestra del tumor, particularmente del material genético de la misma, pase a manos del Instituto Nacional de Pediatría, pudiendo realizar otras pruebas ulteriores sin necesidad de que sea informado de ello.

#### X.DERECHO A DESERTAR

Soy libre de excluir del estudio a mi hijo(a) en cualquier momento. En el caso de que tome esta decisión, estoy informado que el tratamiento y el seguimiento no cambiarán.

XI. No existe algún tipo de beneficio adicional financiero para mi o algún miembro de mi familia.

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

Firma del Padre o Tutor

Firma del Investigador

Firma de Testigo

Firma de Testigo

### ANEXO III

#### HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

INICIALES: \_\_\_\_\_ REGISTRO: \_\_\_\_\_ EDAD (años): \_\_\_\_\_  
DIAGNOSTICO: RMS OSM SE

#### RABDOMIOSARCOMA

- 1) ESTADIO: I II III IV
- 2) VOLUMEN TUMORAL (cm):  
I (inicial) \_\_\_\_\_ II (después de neoadyuvancia) \_\_\_\_\_
- 3) HISTOLOGIA: EMBRIONARIO ALVEOLAR  
PLEOMORFICO ANAPLASICO
- 4) LOCALIZACION: \_\_\_\_\_
- 5) METASTASIS: SI NO
- 6) NECROSIS TUMORAL (%): \_\_\_\_\_
- 7) EXPRESIÓN MDR1/GP-P: \_\_\_\_\_
- 8) RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA: \_\_\_\_\_

#### OSTEOSARCOMA

- 1) ESTADIO: NO METASTASICO METASTASICO
- 2) VOLUMEN TUMORAL (cm):  
I (inicial) \_\_\_\_\_ II (después de neoadyuvancia) \_\_\_\_\_
- 3) HISTOLOGIA: OSTEOLASTICO CONDROBLASTICO  
OTRA \_\_\_\_\_
- 4) LOCALIZACION: \_\_\_\_\_
- 5) METASTASIS: SI NO
- 6) NECROSIS TUMORAL (%): \_\_\_\_\_
- 7) EXPRESIÓN MDR1/GP-P: \_\_\_\_\_
- 8) RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA: \_\_\_\_\_

#### SARCOMA DE EWING

- 1) ESTADIO: UNICO MULTICENTRICO METASTASICO
- 2) VOLUMEN TUMORAL (cm):  
I (inicial) \_\_\_\_\_ II (después de neoadyuvancia) \_\_\_\_\_
- 3) LOCALIZACION: AXIAL EXTRAXIAL
- 4) METASTASIS: SI NO
- 5) NECROSIS TUMORAL (%): \_\_\_\_\_
- 6) EXPRESIÓN MDR1/GP-P: \_\_\_\_\_
- 7) RESPUESTA A LA NEOADYUVANCIA: \_\_\_\_\_

**ANEXO IV**  
Tablas y Figuras

AUTOR	TECNICA DE MEDICION DE LA EXPRESION MDR1/Gp-P	RELACION EXPRESION MDR1/Gp-P(pronóstico)
Chan H., et.al (1990)	Inmunohistoquímica (C219 y/o C494)	Pronóstico Desfavorable
Chan H., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (C219 y C494)	Pronóstico Desfavorable
Bergier V., et.al (1993)	MRNA (Norther y Dot Blot, Hibridación in situ) Inmunohistoquímica (C219, JSB1, MRK16)	No Asociación Pronóstica
Stein U., et.al (1993)	MRNA (Norther y Slot Blot)	No asociación
Dumontet C., et.al (1996)	RT-PCR	No Asociación Pronóstica
Kutetes J., et.al (1996)	Inmunohistoquímica (C219, C494, JSB1)	Pronóstico Desfavorable
Levine E., et.al (1997)	Inmunohistoquímica (Ki-67) RT-PCR	No Asociación Pronóstica para RT-PCR
Jiménez R., et.al (1999)	Inmunohistoquímica (C494 y JSB1)	Pronóstico Desfavorable
Plata B., et.al (2000)	Inmunohistoquímica (LRP)	Pronóstico Desfavorable

TABLA 1: Relación de la expresión de mdr1/Gp-P y rbdmiosarcomas.

AUTOR	TECNICA DE MEDICION DE LA EXPRESION MDR1/Gp-P	SIGNIFICANCIA DIAGNOSTICA (pronóstico desfavorable)
Chan H., et.al (1990)	Inmunohistoquímica (C219 y/o C494)	DNS
Chan H., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (C219 y C494)	Sens.= 0.04 Espec.= 0.62 VP+= 0.25 VP-= 0.20
Vergier V., et.al (1993)	MRNA (Norther y Dot Blot, Hibridación in situ) Inmunohistoquímica (C219, JSB1, MRK16)	DNS
Stein U., et.al (1993)	MRNA (Nortersh y Slot Blot)	DNS
Dumontet C., et.al (1996)	RT-PCR	*Evaluan resistencia a paclitaxel
Kutetesch J., et.al (1996)	Inmunohistoquímica (C219, C494, JSB1)	RR= 2.6
Levine E., et.al (1997)	Inmunohistoquímica (Ki-67) RT-PCR	DNS
Jiménez R., et.al (1999)	Inmunohistoquímica (C494 y JSB1)	Sens.= 0.70 Espec.=0.43 VP+=0.10 VP-=0.36
Plaat B., et.al (2000)	Inmunohistoquímica (LRP)	Sens.= 0.50 Espec.= 0.0 VP+= 0.50 VP-= 0.0

TABLA 2: Significancia diagnóstica de la expresión de mdr1/Gp-P en rhabdomyosarcomas. DNS= Datos no Suficientes.



AUTOR	TECNICA DE MEDICION DE LA EXPRESION MDR1/Gp-P	RELACION EXPRESION MDR1 / MDR (pronóstico)
Schnyder SD., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (C219)	Pronóstico Desfavorable
Baldini N., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (C219, MRK16, JSB1)	Pronóstico Desfavorable
Kandel R., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (JSB1) RT-PCR	No Asociación Pronóstica
Duensing S., et.al (1996)	Inmunohistoquímica (C219)	Pronóstico Desfavorable
Scotlandi K., et.al (1996)	Inmunohistoquímica (JSB1)	Pronóstico Desfavorable
Chan H., et.al (1997)	Inmunohistoquímica (C494, C219)	Pronóstico Desfavorable
Zinder SD., et.al (1998)	Inmunohistoquímica (C219)	No Asociación Pronóstica
Takeshita H., et.al (2000)	Inmunohistoquímica (C219)	No Asociación Pronóstica

TABLA 3: Relación de la expresión de mdr1/Gp-P y osteosarcomas.

AUTOR	TECNICA DE MEDICION DE LA EXPRESION MDR1/Gp-P	RELACION EXPRESION MDR1 / MDR (pronóstico desfavorable)
Schnyder SD., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (C219)	Sens.= 0.54 Espec.= 0.40 VP+= 0.75 VP-= 0.28
Baldini N., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (C219, MRK16, JSB1)	Sens.= 0.32 Espec.= 0.76 VP+= 0.78 VP-= 0.29
Kandel R., et.al (1995)	Inmunohistoquímica (JSB1) RT-PCR	*Evalúan asociación de expresión con estadio
Duensing S., et.al (1996)	Inmunohistoquímica (C219)	DNS
Scotlandi K., et.al (1996)	Inmunohistoquímica (JSB1)	DNS
Chan H., et.al (1997)	Inmunohistoquímica (C494, C219)	DNS
Zinder SD., et.al (1998)	Inmunohistoquímica (C219)	DNS
Takeshita H., et.al (2000)	Inmunohistoquímica (C219)	DNS

TABLA 4: Significancia diagnóstica de la expresión de mdr1/Gp-P en osteosarcomas.

DNS: Datos no Suficientes

Variable		N	Porcentaje
Respuesta a la Neoadyuvancia	sin respuesta	3	50.0%
	respuesta parcial	1	16.7%
	respuesta completa	2	33.3%
Expresion de mdr1	expresion elevada	2	33.3%
	expresion baja	3	50.0%
	sin expresion	1	16.7%
Volumen Tumoral Inicial	400.00	1	16.7%
	800.00	1	16.7%
	1100.00	1	16.7%
	4000.00	1	16.7%
	7500.00	1	16.7%
	9000.00	1	16.7%
Histologia	favorable	1	16.7%
	desfavorable	5	83.3%
Tipo De Tumor	rabdomiosarcoma	3	50.0%
	sarcoma de ewing	3	50.0%

TABLA 5: Descripción de las variables con su porcentaje relativo según la categoría

CASO	EDAD (meses)	GENERO	DIAGNOSTICO	SITIO	HISTOLOGIA
1	14	M	Sarcoma de Ewing	No favorable	No favorable
2	94	M	Sarcoma de Ewing	No favorable	No favorable
3	72	M	Rabdomiosarcoma	Favorable	Favorable
4	180	F	Rabdomiosarcoma	Favorable	No favorable
5	96	M	Sarcoma de Ewing	No favorable	No favorable
6	34	F	Rabdomiosarcoma	Favorable	No favorable

CASO	ESTADIO	VOLUMEN TUMORAL INICIAL*	VOLUMEN TUMORAL FINAL*	NECROSIS (%)	EXPRESION mdr1	IHQ Gp-P	RESPUESTA
1	IV	4500	6.00	100	Positiva	++	Completa
2	III	200	15.0	85	Negativa	NR	Parcial
3	IV	3700	3500	5	Positiva	NR	Sin respuesta
4	III	400	0.00	100	Negativa	-	Completa
5	IV	550	400	20	Negativa	NR	Sin respuesta
6	IV	2000	900	20	Negativa	-	Sin respuesta

TABLA 6: Características Generales de la población en estudio. F: femenino; M: masculino. \*Volumen expresado en cm<sup>3</sup>. IHQ Gp-P: inmunohistoquímica para Glicoproteína-P. NR: no se realizó.

#### Ajuste del Modelo

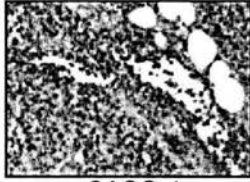
Modelo	-2 Log Likelihood	Chi-Cuadrada	gl	Significancia
Solo Intercepto	12.137			
Final	.000	12.137	10	.276

TABLA 7. Ajuste del modelo de función discriminante. gl = grados de libertad.

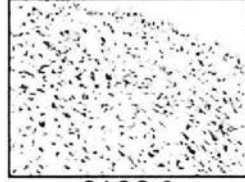
RABDOMIOSARCOMAS TINCION HEMATOXILINA Y EOSINA



CASO 3

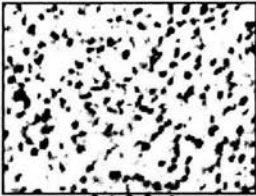


CASO 4



CASO 6

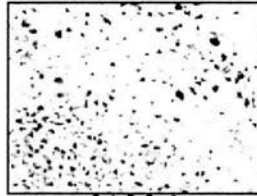
RABDOMIOSARCOMAS TINCION DE MIOGENINA



CASO 3

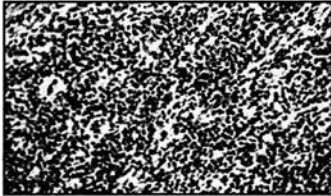


CASO 4

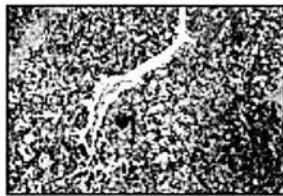


CASO 6

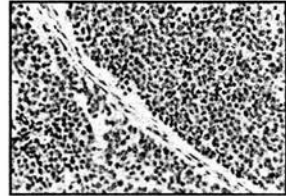
SARCOMAS DE EWING



CASO 1



CASO 2



CASO 5

FIGURA 1. Estudio histopatológico para el diagnóstico de los pacientes con rhabdomyosarcomas y sarcomas de Ewing.

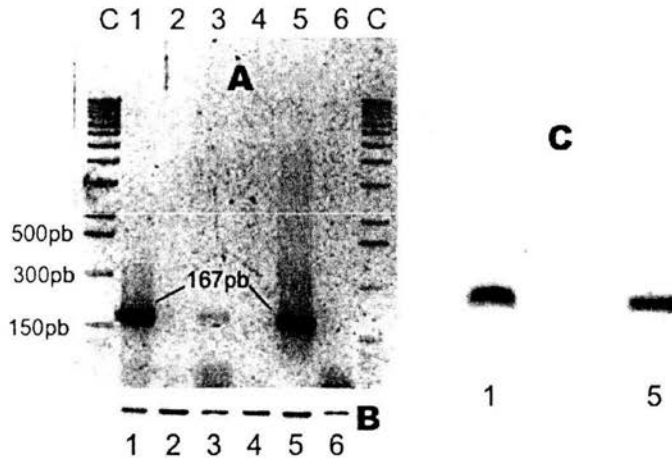


Figura 2. Autorradiografía de geles de agarosa resultantes de la prueba de RT-PCR para medición de la expresión de *mdr1*. **A**, Corrimiento de *mdr1*: en los carriles de ambos extremos (C) las bandas corresponden a controles de peso molecular, el más inferior de ellos indica el correspondiente a 150pb; en los carriles 1 y 5 se encuentran las bandas positivas para *mdr1*, correspondientes a más de 160pb.; carriles 2, 3, 4, 6 sin bandas. **B**, Control con  $\beta 2$  microglobulina que resultó positivo en todos los casos mostrando bandas que corresponden a 120pb. . **C**, Corrimiento de *mdr1*, sólo los casos positivos (muestras de los carriles 1 y 5 de la figura A), las bandas corresponden a un poco más de 160pb.

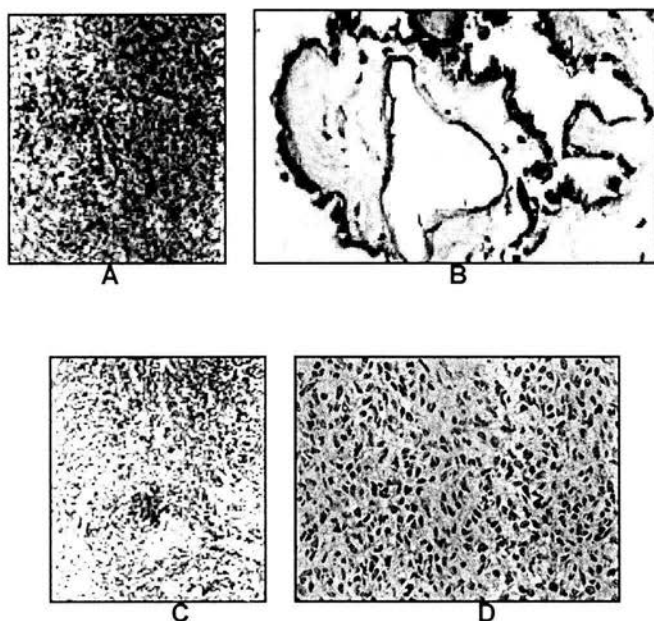


FIGURA 3. Inmunihistoquímica (IHQ) para Glicoproteína P. El estudio se realizó en tres casos ((1, 4 y 6). **A.** Patrón positivo ++ del caso 1, concentración citoplasmática en las células neoplásicas. **B.** Control positivo, plexos coroideos que muestran un patrón citoplasmático en las células de todo el epitelio coroideo. **C y D.** Tinciones negativas de los casos 4 y 6; en C se puede observar un que un número muy reducido de células presentan un patrón citoplasmático, por lo que se consideró negativ.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Chan H, Thorner P, Haddad G, Ling V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol*, 1990; 8(4): 689-704.
- 2.-Melton L. Cellular pump changes prospect of disease resistance. *Lancet*, 2001; 357: 1186.
- 3.-Liu Q, Ohshima K, Kikuchi M. High expression of mdr-1 gene and p-glycoprotein in initial and re-biopsy specimens of relapsed B-cell lymphoma. *Histopathology*, 2001; 38: 209-216.
- 4.-van Kalken C, Pinedo H, Giaccone G. Multidrug resistance from the clinical point of view. *Eur J Cancer*, 1991; 27 (11): 1484-1490.
- 5.-Jimenez R, Zalupski M., Frank J, Du W, Ryan J, Lucas D. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. *Cancer*, 1999; 86 (6): 976-981.
- 6.-Marie JP. P-glycoprotein in hematologic malignancies. *Hematol Oncol Clin Nort Am*, 1995; 9(2):239-249.
- 7.-Levine E, Holzmayer T, Bacus S, Mechetner E, Mera R, Bolliger C, Roninson I, Das Gupta T. Evaluation of newer prognostic markers for adult soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*, 1997; 15 (10): 3249-3257.
- 8.-Linn S, Giaccone G, van Diest P, Blokhuis W, van der Valk P, van Kalken C, Kuiper C, Pinedo H, Baak J. Prognostic relevance of p-glycoprotein expression in breast cancer. *Ann Oncol*, 1995; 6: 679-685.
- 9.-Dalton W. Drug resistance modulation in the laboratory and the clinic *Sem Oncol*, Feb, 1993; 20 (1): 64-69.
- 10.-Lum B, Gosland M. MDR expression in normal tissues. *Hematol Oncol Clin Nort Am*, Apr 1995; 9 (2):319-336.
- 11.- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman M., Pastan I, Willingham M. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product p-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7735-7738.
- 12.-Leighton J Goldstein L. P-glycoproteins in adult solid tumors. *Hematol Oncol Clin Nort Am*, 1995; 9(2):251-273.
- 13.-Nooter K, Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *J Cancer*, 1991; 63: 663-669.
- 14.-Chan H, Haddad G, Thorner P, DeBoer G, Ping-Lin Y, Ondrusek N, Yeger H, Ling V. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Eng J Med*, 1991; 325 (23):1608-1614.
- 15.-Kanerva J, et.al. Initial P-glycoprotein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: no evidence in prognostic impact in follow-up. *Ped Hematol Oncol*, 2001; 18: 27-36.
- 16.-Kuttesch J, et.al. P-glycoprotein expression at diagnosis may not be a primary mechanism of failure in childhood rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 1996; 14 (3): 886-900.

- 17.-Chan H, DeBoer G, Haddad G, Ling V. Multidrug resistance in pediatric sarcomas. *Hematol Oncol Clin Nort Am*, 1995; 9(4):889-908.
- 18.- Plaat B, Hollema H, Molenaar W, Torn G, Pijpe J, Mastik M., Hoekstra H, van den Berg E, Scheper R, van der Graaf W. Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stroma tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins. *J Clin Oncol*, 2000; 18 (18): 3211-3220.
- 19.- Stein U, Wunderlich V, Haensch W, Schmidt-Peter P. Expression of the *mdr1* gene in bone and soft tissue sarcomas of adult patients. *Eur J Cancer*, 1993; 29A (14): 1979-1981.
- 20.-Dumonet C, Duran G, Steger K, Beketic-Oreskovic L, Sikic B. Resistance mechanisms in human sarcoma mutants derived by single-step exposure to paclitaxel (taxol). *Cancer Res*, 1996; 56: 1091-1097.
- 21.- Vergier B, Cany L, Bonnet F, Robert J, Mascarel A, Coindre JM. Expression of *mdr1/P* glycoprotein in human sarcomas. *Br J Cancer*, 1993; 68: 1221-1226.
- 22.-Chan H, Grogan T, Haddad G, DeBoer G, Ling V. P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89(22):1706-1715.
- 23.- Scotlandi K, et.al. Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma. *Cancer Res*, 1996; 56: 2434-2439.
- 24.-Baldini N, et.al. Expression of P-glycoprotein in High grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Eng J Med*, 1995;333 (21):1380-1385.
- 25.-Duensing S, Ganser A, Atzpodien J. P-glycoprotein and multidrug resistance. *N Eng J Med*, 1996; 334 (20): 1335-1337.
- 26.- Schnyder SD, Pringle J, Archer CW. Expression of p-glycoprotein pre- and post-operative chemotherapy. *Br J Cancer*, 1995; 69 suppl 21: 30.
- 27.-Kandel R, Campbell S, Noble-Topham S, Bell R, Andrulis I. Correlation of P-glycoprotein detection by immunohistochemistry *mdr-1* mRNA levels in osteosarcomas. *Diagnos Mol Pathol*, 1995; 4 (1): 59-65.
- 28.- Schnyder SD, Hayes AJ, Pringle J, Archer CW. P-glycoprotein and metallothionein expression and resistance to chemotherapy in osteosarcoma. *Br J Cancer*, 1998; 78 (6): 757-759.
- 29.- Takeshita H, Kususaki K, Murata H, Sugino-shita T, Hirata M., Hashiguchi S, Ashihara T, Gebhardt MC, Mankin HJ, Hirasawa Y. Osteoblastic differentiation and p-glycoprotein multidrug resistance in a murine osteosarcoma model. *Br J Cancer*, 2000; 82 (7): 1327-1331.
- 30.- Perri T, Fogel M, Mor S, Horev G, Meller I, Loven D, Issakov J, Kollender Y, Smirnov A, Zaizov R, Cchen IJ. Effect of P-glycoprotein expression on outcome in the Ewing family of tumors. *Pediatr Hematol Oncol*, 2001 Jul-Aug; 18 (5): 325-334.
- 31.-Allen J, Brinkhuis R, van-Deemter L, Wijnholds J, Schinkel A. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and *Mrp1* to basal drug resistance. *Cancer Res*, 2000; 60: 5761-5766.
- 32.-Beck W, et.al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res*, 1996; 56:3010-3020.
- 33.-Broxterman HJ, Schuurhuis GJ, Lankelma J, Oberink JW, Eekman CA, Claessen AME, Hoekman K, Poot M, Pinedo HM. Highly sensitive and specific detection of P-

- glycoprotein function for haematological and solid tumor cells using a novel nucleic acid stain. *Br J Cancer*, 1997;76 (8): 1029-1034.
- 34.-Chan H, DeBoer G, Haddad G, Gallie B, Ling V. Multidrug resistance in pediatric malignancies. *Hematol Oncol Clin Nort Am*, 1995; 9(2):275-318.
- 35.-Edwards R, Chatten J, Xiong QB, Barr F. Detection of gene fusions in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase- polymerase chain reaction assay of archival samples. *Diag Mol Pathol*, 1997; 6 (2): 91-97.
- 36.-Fojo A, Ueda K, Slamon D, Poplack D, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 265-269.
- 37.-Schadendorf D, Herdfort R, Czarnetzki B. P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 1995; 132: 551-551.
- 38.-Schlaifer D, et.al. Immunohistochemical detection of multidrug resistance associated p-glycoprotein in tumor and stromal cells of human cancers. *Br J Cancer*, 1990; 62: 177-182.
- 39.-Noonan K, Beck C, Holzmayer T, Chin J, Wunder J, Andrulis I, Gazard A, William C, Griffith B, von Hoff D, Roninson I. Quantitative analysis of *mdr1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 7160-7164.
- 40.-Goldstein E, et-al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 1989; 81 (2): 116-124.
- 41.- Gros P, Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 1986; 323 (23): 728-731.
- 42.-Hoffman J, Schmidt-Peter P, Hansch W, Naundorf H, Bunge A, Becker M., Fichtner I. Anticancer drug sensitivity and expression of multidrug resistance markers in early passage human sarcomas. *Clin Cancer Res*, 1999; 5: 2198-2204.
- 43.-Pinedo H, Giaccone G. P-glycoprotein- a marker of cancer-cell behavior. *N Eng J Med*, 1996; 333 (21): 1417-1419.
- 44.-Ruano J, Calderón C. *Oncología Medicoquirúrgica Pediátrica*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 1ª edición, 2001.