

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

**El ácido *all trans* retinoico reduce *in vitro* el
efecto protumoral de los factores de
crecimiento e incrementa la eficacia de la
quimioterapia en el rabdomiosarcoma S4MH**

**Roberto Sanisidro Torre
Leioa, 2014**

El ácido *all trans* retinoico reduce *in vitro* el efecto protumoral de los factores de crecimiento e incrementa la eficacia de la quimioterapia en el rabdomiosarcoma S4MH

**Roberto Sanisidro Torre
Leioa, 2014**

Directores de Tesis
Dr. Teodoro Palomares Casado
Dra. Ana Isabel Alonso Varona

Facultad de Medicina y Odontología
Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco
Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a la financiación recibida en la Convocatoria de Apoyo a los Grupos de Investigación de la UPV/EHU (Proyecto GIU 10/16).

**AUTORIZACIÓN DEL/LA DIRECTORA/A DE TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN**

Drs. **Teodoro Palomares Casado y Ana Isabel Alonso Varona**, con N.I.F. **16249147-S**
y 24402900-S,

como Directores de la Tesis Doctoral: **El ácido *all trans* retinoico reduce *in vitro* el efecto protumoral de los factores de crecimiento e incrementa la eficacia de la quimioterapia en el rabdomiosarcoma S4MH**,

realizada en el Departamento de **Cirugía, Radiología y Medicina Física**,

por el Doctorando Don **Roberto Sanisidro Torre**,

autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Leioa a de de 2014

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

Fdo.: **Teodoro Palomares Casado**

Fdo.: **Ana Isabel Alonso Varona**

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento **Cirugía, Radiología y Medicina Física**

en reunión celebrada el día de de 2014, ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada **El ácido *all trans* retinoico reduce *in vitro* el efecto protumoral de los factores de crecimiento e incrementa la eficacia de la quimioterapia en el rabdomiosarcoma S4MH**

dirigida por el Dr. **Teodoro Palomares Casado** y la Dra. **Ana Isabel Alonso Varona** y presentada por **Roberto Sanisidro Torre** ante este Departamento.

En Leioa a de de 2014

Vº Bº

DIRECTOR/A DEL DEPARTAMENTO

SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: _____

Fdo.: _____

ACTA DE GRADO DE DOCTOR

ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO DON **Roberto Sanisidro Torre**

TITULO DE LA TESIS: **El ácido *all trans* retinoico reduce *in vitro* el efecto protumoral de los factores de crecimiento e incrementa la eficacia de la quimioterapia en el rabdomiosarcoma S4MH**

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por _____ la calificación de:

unanimidad ó mayoría

SOBRESALIENTE / NOTABLE / APROBADO / NO APTO

En Leioa a _____ de _____ de _____

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

Dr/a: _____

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: ____

*A mi abuela Emilia y mi hija Alaitz,
que representan el pasado presente y el presente futuro*

*In memoriam
Cipriano, Eduardo, Rosa e Iñaki,*

Agradecimientos

Antes de nada quiero disculparme por aquellos que no nombre pero que sí estuvieron, están y estarán conmigo, pues sin ellos no hubiera sido posible esta aventura.

A mis directores de Tesis, Teodoro Palomares, por enseñarme a buscar la perfección en todo lo que haga y Ana Alonso, por mostrarme que los detalles son importantes.

A Ignacio García Alonso, por descubrirme que el trabajo no está reñido con el placer y a todos ellos por darme la oportunidad de disfrutar aprendiendo.

A mi familia, y en especial a mis padres Eduardo y María Encarnación, si estuviera agradeciéndooos lo que me queda de vida todo lo que habéis hecho por mí, me quedaría infinitamente corto.

A Mónica, por tus valores humanos que me han enseñado el camino correcto.

A mis amigos, para todos y cada uno mi agradecimiento y mi orgullo de sentirme vuestro amigo, sin vosotros sería una persona infinitamente peor de la que soy.

A quienes me acompañaron en mi andadura universitaria, todos han aportado su granito de arena al licenciado que soy.

Y por último, a todos aquellos compañeros y compañeras de doctorado, animalario, departamentos, con los que he compartido alegrías y penas, pero sobre todo expectativas de futuro, muchas gracias.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE MATERIAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
ABREVIATURAS	xvii

ÍNDICE DE MATERIAS

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	1
II.INTRODUCCIÓN	5
II.1. Los sarcomas de partes blandas	7
II.1.1. Concepto.....	7
II.1.2. Etiología y tipos.....	7
II.2. El rabdomiosarcoma	11
II.2.1. Concepto e incidencia.....	11
II.2.2. Etiología	12
II.2.3. Tipos histológicos.....	13
II.2.3.1. RMS Embrionario (ERMS).....	14
II.2.3.1.1. RMS Botrioide.....	15
II.2.3.1.2. RMS Fusiforme.....	16
II.2.3.2. RMS Alveolar (ARMS).....	16
II.2.3.3. RMS Pleomórfico (PRMS).....	17
II.2.4. Expresión citogenética del rabdomiosarcoma.....	18
II.2.5. Clasificación clínica	20
II.2.6. Diagnóstico	22
II.2.7. Tratamiento	24
II.2.7.1. Cirugía	26
II.2.7.2. Radioterapia.....	26
II.2.7.3. Quimioterapia	27
II.2.8. Supervivencia a largo plazo y esperanza de vida	30
II.2.9. Nuevas estrategias terapéuticas.....	32

II.3. Factores de crecimiento	36
II.3.1. Factor de crecimiento hepatocitario (HGF/SF)	37
II.3.1.1. Estructura y Funciones biológicas	37
II.3.1.2. Vías de señalización	38
II.3.1.3. Implicación en el desarrollo tumoral	39
II.3.1.4. Estrategias terapéuticas.....	41
II.3.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	42
II.3.2.1. Estructura y Funciones biológicas	42
II.3.2.2. Vías de señalización	43
II.3.2.3. Implicación en el desarrollo tumoral	44
II.3.2.4. Estrategias terapéuticas.....	46
II.3.3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	47
II.3.3.1. Estructura y funciones del EGF	47
II.3.3.2. Vías de señalización	48
II.3.3.3. Implicación en el desarrollo tumoral	49
II.3.3.4. Estrategias terapéuticas.....	50
II.3.4. Factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-II).....	51
II.3.4.1. Estructura y función	51
II.3.4.2. Vías de señalización	53
II.3.4.3. Implicación en el desarrollo tumoral	55
II.3.4.4. Estrategias terapéuticas.....	56
II.3.5. Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF _b)	58
II.3.5.1. Estructura y funciones	58
II.3.5.2. Vía de señalización	59
II.3.5.3. Implicación en el desarrollo tumoral	60
II.3.5.4. Estrategias terapéuticas.....	61
II.3.6. Factor de crecimiento plaquetario-BB (PDGF-BB)	62
II.3.6.1. Estructura y funciones	62
II.3.6.2. Vía de señalización	63
II.3.6.3. Implicación en el desarrollo tumoral	65
II.3.6.4. Estrategias terapéuticas.....	65

II.4. Agentes inductores de la diferenciación celular como agentes antitumorales...	67
II.4.1. Los retinoides.....	67
II.4.1.1. Ácido all-trans retinoico (ATRA).....	68
II.4.1.1.1. Estructura y funciones.....	68
II.4.1.1.2. Vía de señalización.....	70
II.4.1.1.3. Actividad antitumoral.....	72
II.4.1.2. Retinoides sintéticos.....	73
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
III.1. Materiales.....	79
III.1.1. Células tumorales.....	79
III.1.2. Cultivos celulares.....	79
III.1.2.1. Frascos y placas de cultivo.....	80
III.1.2.2. Medios de cultivo.....	80
III.1.2.3. Soluciones tamponadas.....	80
III.1.3. Fármacos.....	81
III.1.3.1. Melfalán.....	81
III.1.3.2. Vincristina (VCR).....	81
III.1.3.3. Actinomicina D (ACD).....	82
III.1.3.4. Ácido all trans retinoico (ATRA).....	83
III.1.5. Factores de crecimiento (FC).....	84
III.1.5.1. Factor de crecimiento hepatocitario (HGF).....	84
III.1.5.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	84
III.1.5.3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	84
III.1.5.4. Factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-II).....	84
III.1.5.5. Factor de crecimiento plaquetario (PDGF-BB).....	85
III.1.5.6. Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF _b).....	85
III.2. Métodos.....	85
III.2.1. Cultivos celulares.....	85
III.2.1.1. Descongelación y mantenimiento de las células S4MH.....	85
III.2.1.2. Congelación de las células S4MH.....	86

III.2.1.3. Siembre de las suspensiones celulares en placas	86
III.2.1.4. Determinación de la proliferación celular	87
a) Determinación del índice de proliferación (IP).....	87
b) Determinación de la cinética proliferativa (CP)	88
c) Determinación de la Ratio cinético proliferativa (Ratio CP)	88
d) Determinación del factor modificador de dosis(FMD)	88
III.2.2. Procedimientos experimentales	89
III.2.2.1. Estudio del efecto de los FCs HGF, VEGF, IGF-II, PDGF-BB, FGF _b y EGF	89
III.2.2.2. Estudio del efecto del ATRA	90
III.2.2.3. Estudio del efecto del ATRA en presencia de los FCs.....	90
III.2.2.4. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD	91
III.2.2.5. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD en presencia de los FCs	92
III.2.2.6. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD en combinación con ATRA.....	93
III.2.2.7. Estudio del efecto combinado de los agentes quimioterápicos y el ATRA en presencia de los FCs	94
III.2.3. Análisis estadísticos	95
III.2.3.1. Media aritmética y desviación estándar	95
III.2.3.2. Análisis de la varianza	96
IV.RESULTADOS.....	99
IV.1. Estudio del efecto de los factores de crecimiento sobre la dinámica proliferativa de las células S4MH	101
IV.1.1. Efecto del factor de crecimiento hepatotrófico HGF.....	101
IV.1.2. Efecto del factor de crecimiento similar a la insulina IGF-II.....	101
IV.1.3. Efecto del factor de crecimiento plaquetario PDGF-BB.....	102
IV.1.4. Efecto del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF.....	103
IV.1.5. Efecto del factor de crecimiento fibroblástico básico FGF _b	104
IV.1.6. Efecto del factor de crecimiento epidérmico EGF	105

IV.1.7. Comparación del efecto de los factores de crecimiento HGF, IGF-II, PDGF-BB, VEGF, EGF y FGF _b sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	106
IV.2. Estudio del efecto del ácido all-trans retinoico (ATRA) sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	107
IV.3. Estudio del efecto del ATRA sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH en presencia de los factores de crecimiento	108
IV.3.1. Estudio del efecto del ATRA en presencia de HGF.....	108
IV.3.2. Estudio del efecto del ATRA en presencia de IGF-II.....	108
IV.3.3. Estudio del efecto del ATRA en presencia de PDGF-BB	109
IV.3.4. Estudio del efecto del ATRA en presencia de VEGF	110
IV.3.5. Estudio del efecto del ATRA en presencia de FGF _b	111
IV.3.6. Estudio del efecto del ATRA en presencia de EGF	112
IV.3.7. Comparación del efecto del ATRA en presencia de los factores de crecimiento EGF, FGF _b , HGF, IGF-II, PDGF-BB y VEGF sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH.....	113
IV.4. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH.....	115
IV.4.1. Estudio del efecto del Melfalán	115
IV.4.2. Estudio del efecto de la VCR.....	116
IV.4.3. Estudio del efecto de la ACD.....	116
IV.4.4. Comparación del efecto de la ACD, la VCR y el Melfalán sobre la proliferación y cinética proliferativa de las células S4MH	117
IV.5. Estudio del efecto del melfalán en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH	119
IV.5.1. Estudio del efecto del melfalán en presencia de HGF	119
IV.5.2. Estudio del efecto del melfalán en presencia de IGF-II	119
IV.5.3. Estudio del efecto del melfalán en presencia de PDGF-BB.....	120
IV.5.4. Estudio del efecto del melfalán en presencia de VEGF	121
IV.5.5. Estudio del efecto del melfalán en presencia de FGF _b	122
IV.5.6. Estudio del efecto del melfalán en presencia de EGF	123

IV.5.7. Comparación del efecto del melfalán en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	124
IV.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH.....	126
IV.7. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH	127
IV.7.1. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de HGF	127
IV.7.2. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de IGF-II	128
IV.7.3. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de PDGF-BB	129
IV.7.4. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de VEGF	130
IV.7.5. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de FGF _b	131
IV.7.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de EGF.....	132
IV.7.7. Comparación del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y cinética proliferativa de las células S4MH.....	133
IV.8. Estudio del efecto de la VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH.....	136
IV.8.1. Estudio del efecto de la VCR en presencia de HGF	136
IV.8.2. Estudio del efecto de la VCR en presencia de IGF-II	137
IV.8.3. Estudio del efecto de la VCR en presencia de PDGF-BB	137
IV.8.4. Estudio del efecto de la VCR en presencia de VEGF	138
IV.8.5. Estudio del efecto de la VCR en presencia de FGF _b	139
IV.8.6. Estudio del efecto de la VCR en presencia de EGF	140

IV.8.7. Comparación del efecto de la VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	141
IV.9. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH.....	143
IV.10. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH	144
IV.10.1. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de HGF	144
IV.10.2. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de IGF-II	145
IV.10.3. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de PDGF-BB	145
IV.10.4. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de VEGF	146
IV.10.5. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de FGF _b	147
IV.10.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de EGF	148
IV.10.7. Comparación del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	149
IV.11. Estudio del efecto de la ACD en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH	152
IV.11.1. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de HGF ...	152
IV.11.2. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de IGF-II..	152
IV.11.3. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de PDGF-BB... ..	153
IV.11.4. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de VEGF..	154
IV.11.5. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de FGF _b ...	154

IV.11.6. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de EGF	155
IV.11.7. Comparación del efecto de la ACD en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	156
IV.12. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH.....	158
IV.13. Efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de la línea celular S4MH	159
IV.13.1. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de HGF	159
IV.13.2. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia IGF-II.....	160
IV.13.3. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia PDGF-BB	160
IV.13.4. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia VEGF.....	161
IV.13.5. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia FGF _b	162
IV.13.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia EGF	163
IV.13.7. Comparación del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH	164
V.DISCUSIÓN	167
VI.CONCLUSIONES.....	179
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tumores de tejidos blandos. Supervivencia a 5 años del diagnóstico por cohortes en España. Periodo 1980-2004.....	9
Figura 2. Rbdomiosarcoma. Supervivencia a 5 años del diagnóstico por cohortes en España. Periodo 1980-2004.....	12
Figura 3. RMS embrionario.....	15
Figura 4. RMS botrioide.....	16
Figura 5. RMS fusiforme.....	16
Figura 6. RMS alveolar.....	17
Figura 7. RMS pleomórfico o anaplásico.....	18
Figura 8. Actividad intracelular del RA	69
Figura 9. Línea celular S4MH	79
Figura 10. Estructura química del melfalán.....	81
Figura 11. Estructura química de la VCR	82
Figura 12. Estructura química de la ACD	83
Figura 13. Estructura química del ATRA.....	83
Figura 14. Secuencia temporal de los ensayos.....	89
Figura 15. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los FCs.....	90
Figura 16. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con ATRA.....	90
Figura 17. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los FC y el ATRA ...	91
Figura 18. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los fármacos antitumorales	92
Figura 19. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los fármacos antitumorales en presencia de los FC	93
Figura 20. Pauta de tratamiento de las células S4MH con los fármacos antitumorales y el ATRA.....	94
Figura 21. Pauta de tratamiento de las células S4MH con los fármacos antitumorales y el ATRA, en presencia de los FC.	95
Figura 22. Efecto del HGF (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	101

Figura 23. Efecto del IGF-II (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	102
Figura 24. Efecto del PDGF-BB (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	103
Figura 25. Efecto del VEGF (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	104
Figura 26. Efecto del FGF _b (10 ng/ml) a dosis de SBF del 7.5% sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	105
Figura 27. Efecto del EGF (25 ng/ml) a dosis de SBF del 7.5% sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	105
Figura 28. Efecto de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.....	106
Figura 29. Inducción proliferativa ejercida por los factores de crecimiento sobre las células S4MH a las 24 h.	106
Figura 30. Efecto de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP	107
Figura 31. Efecto del ATRA 10 ⁻⁶ M sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	107
Figura 32. Efecto del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	108
Figura 33. Efecto del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	109
Figura 34. Efecto del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	110
Figura 35. Efecto del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	111
Figura 36. Efecto del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP, al reducir la concentración de SBF al 7.5%.....	112
Figura 37. Efecto del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP, al reducir la concentración de SBF al 7.5%.....	112

Figura 38. Comparación del efecto de la adición del ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.....	113
Figura 39. Efecto reductor de la proliferación del ATRA (10-6M) sobre la actividad de los factores de crecimiento a las 24 h	113
Figura 40. Comparación del efecto de la adición del ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.....	114
Figura 41. Efecto del melfalán (2.5µM, 1 hora de exposición) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	115
Figura 42. Efecto de la VCR (5 ng/ml 1 hora de exposición) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	116
Figura 43. Efecto de la ACD (15 ng/ml 1 hora de exposición) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	117
Figura 44. Comparación del efecto del melfalán (2.5 µM), la VCR (5 ng/ml) y la ACD (15 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	118
Figura 45. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	119
Figura 46. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	120
Figura 47. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	121
Figura 48. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	122
Figura 49. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	123
Figura 50. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	124
Figura 51. Comparación del efecto del tratamiento con melfalán en presencia de los factores de crecimiento, sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.....	124
Figura 52. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de los factores de crecimiento sobre la actividad del melfalán a las 48h.....	125

Figura 53. Comparación del efecto del tratamiento con melfalán en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP	125
Figura 54. Efecto del melfalán 2.5 μ M en presencia de ATRA 10 ⁻⁶ M sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	126
Figura 55. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	128
Figura 56. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	129
Figura 57. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	130
Figura 58. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	131
Figura 59. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	132
Figura 60. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	132
Figura 61. Comparación del efecto del tratamiento combinado melfalán (2.5 μ M)+ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.....	133
Figura 62. Efecto de la adición de ATRA (10 ⁻⁶ M) sobre la eficacia antiproliferativa del tratamiento con melfalán (2.5 μ M) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h.....	134
Figura 63. FMD de cada factor de crecimiento sobre el tratamiento combinado melfalán (2.5 μ M)+ATRA (10 ⁻⁶ M) a las 48h.	134
Figura 64. Comparación del efecto del tratamiento combinado melfalán (2.5 μ M)+ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH .Ratio CP.....	135
Figura 65. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	136
Figura 66. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	137

Figura 67. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	138
Figura 68. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	139
Figura 69. Efecto del VCR (5 ng/ml) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	140
Figura 70. Efecto del VCR (5 ng/ml) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	141
Figura 71. Comparación del efecto del tratamiento con VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo	141
Figura 72. Efecto de la VCR (5ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento sobre la actividad de la VCR a las 48h	142
Figura 73. Comparación del efecto del tratamiento con VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP	142
Figura 74. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de ATRA 10 ⁻⁶ M sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	143
Figura 75. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	144
Figura 76. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	145
Figura 77. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	146
Figura 78. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	147
Figura 79. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	148
Figura 80. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	149
Figura 81. Comparación del efecto del tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10 ⁻⁶ M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.....	149

Figura 82. Efecto de la adición de ATRA (10^{-6} M) sobre la eficacia antiproliferativa del tratamiento con VCR (5ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h ..	150
Figura 83. FMD de cada factor de crecimiento sobre el tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h	150
Figura 84. Comparación del efecto del tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP ..	151
Figura 85. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	152
Figura 86. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	153
Figura 87. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	153
Figura 88. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	154
Figura 89. Efecto del ACD (15 ng/ml) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	155
Figura 90. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	155
Figura 91. Comparación del efecto del tratamiento con ACD en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo	156
Figura 92. Efecto de la ACD (15ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento sobre la actividad de la ACD a las 48h	156
Figura 93. Comparación del efecto del tratamiento con ACD en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP	157
Figura 94. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de ATRA (10^{-6} M) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	158
Figura 95. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	159

Figura 96. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de IGF-II (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	160
Figura 97. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	161
Figura 98. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	162
Figura 99. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de FGF _b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	163
Figura 100. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP	164
Figura 101. Comparación del efecto del tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.....	164
Figura 102. Efecto del tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre la RA a las 48h.....	165
Figura 103. FMD de cada factor de crecimiento sobre el tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h	166
Figura 104. Comparación del efecto del tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.....	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos histológicos de sarcomas de partes blandas en función del tejido afecto.....	8
Tabla 2. Incidencia de afectación ganglionar según los diferentes tipos histológicos de SPB en el momento del diagnóstico	10
Tabla 3. Localización del tumor primario y vías de diseminación	13
Tabla 4. Comparación de las diferentes clasificaciones de los rabdomiosarcomas	14
Tabla 5. Alteraciones genéticas presentes en el RMS.....	19
Tabla 6. Clasificación TNM	20
Tabla 7. A) Estadificación del RMS; B) Grupos patológicos del RMS; C) Grupos de riesgo del RMS.....	21
Tabla 8. Marcadores inmunohistoquímicos útiles para el diagnóstico del RMS.....	24
Tabla 9. Factores predictivos de supervivencia tras recidiva en RMS pediátrico en pacientes en estudios III, IVP y IV del IRS	32
Tabla 10. Expresión de HGF y pronóstico tumoral	40
Tabla 11. Agentes con diana en la vía de señalización de IGF.....	57
Tabla 12. Nuevos agentes antitumorales cuya diana es FGF	62
Tabla 13. Inhibidores de PDGF	66
Tabla 14. Agentes inductores de la diferenciación utilizados en las terapias antitumorales	74

ABREVIATURAS

ACD	Actinomicina D
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AR	Ácido retinoico
ARMS	Rabdomiosarcoma alveolar
ATRA	Ácido <i>all trans</i> retinoico
CDC42	<i>Cell division control protein 42</i>
CDK6	<i>Cyclin dependent kinase-6</i>
Cdks	Ciclinas dependientes de kinasas
COG	<i>Chilren oncology group</i> (Grupo de oncología infantil)
COX2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CRBPs	Proteínas citosólicas de unión al ácido retinoico
CWS	<i>Cooperative weichteilsarkom sarcoma</i>
DAG	Diacylglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOCK1	<i>Dedicator of citokinesis-1</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERMS	Rabdomiosarcoma embrionario
FAK	<i>Focal Adhesión Kinases</i>
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FGFBPs	Proteínas de unión a los FGFs

FGFR	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
Flk-1/KDR	<i>Fetal liver kinase-1/kinase domain containing receptor</i>
Flt-1	<i>Fms like tirosine kinase</i>
FMD	Factor modificador de dosis
GAB1	<i>GRB2-Associated binding protein-1</i>
GAG	Glucosaminoglucano
GH	Hormona del crecimiento
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>
GSH	Glutación
HGF/SF	Factor de crecimiento hepatocitario/ <i>Scatter Factor</i>
HGFR	Receptor del factor de crecimiento hepatocitario
HIF1	<i>Hypoxia inducible factor 1</i>
IC₅₀	<i>Inhibition Concentration 50%</i> (concentración de fármaco que reduce la población celular a la mitad)
IE	Irinotecán + etopósido
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBPs	Proteínas de unión a los IGFs
IGFR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IP3	<i>Inositol 1, 4, 5-triphosphate</i>
IR	Receptor de insulina
IRS	Estudio del intergrupo de rabdomiosarcoma
IV	Ifosfamida + vincristina
IVA	Ifosfamida + vincristina + adriamicina
IKKs	<i>I-κ-β-Kinases</i>
JNK	<i>c-Jun kinase</i>

MAPK	Protein kinasa activadora de la mitosis
MEK1	<i>MAPK/ERK Kinase-1</i>
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
MRO	Metabolitos reactivos del oxígeno
NDF/HRG	Factor de diferenciación neu/her regulin
NF-κB	<i>Necrosis factor kappa B</i>
NRP	Neuropilinas
p27/p27KIP1	<i>cyclin dependent kinase inhibitor p-27</i>
PBS	Fosfato buffer salino
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento plaquetario
PI3K	<i>Phosphatidil-inositol 3-kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5 -biphosphate</i>
PKC	<i>Protein kinase-C</i>
PLC-γ	<i>Phospholipase C-kinase</i>
PPAR	Receptores activados por inductores proliferativos de peroxisoma
PRMS	Rabdomiosarcoma pleomórfico
RA	Respuesta antiproliferativa
Rac1	<i>RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RALDHs	Retinal deshidrogenasas
RAR/RXR	Receptores del ácido retinoico
RARE/RXRE	Elementos nucleares del ácido retinoico
Ras	<i>Rat sarcoma virus oncogene</i>
Ratio CP	Ratio cinético proliferativo
Rb	Retinoblastoma
RBP s.....	Proteínas séricas de unión al ácido retinoico
RDHs	Retinol deshidrogenasas
RMS	Rabdomiosarcoma

RNTI-SEOP	Registro nacional de tumores infantiles Sociedad española de oncología pediátrica
SIOP	Sociedad internacional de oncología pediátrica
SNC	Sistema nervioso central
SPB	Sarcomas de partes blandas
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta
TK	Tirosin kinasa
TMM	Tumores mesenquimales malignos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando del factor de necrosis tumoral inductor de apoptosis
VA	Vincristina + actinomicina D
VAC	Vincristina + actinomicina D + ciclofosfamida
VCR	Vincristina
VDC	Vincristina + doxorubicina + Cciclofosfamida
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
VPF	Factor de permeabilidad vascular

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El rabdomiosarcoma (RMS) es el sarcoma de partes blandas (SPB) más frecuente en la población infantil y juvenil en el mundo occidental, constituyendo el 4-8% de las enfermedades oncológicas en niños con edad inferior a los 15 años.

El RMS es una enfermedad cuyo pronóstico y tasa de supervivencia libre de tumor dependen en gran medida de varios factores: tipo histológico, localización del tumor primario, grado de diferenciación del RMS, posible recidiva y aparición de metástasis.

En la actualidad y gracias a los avances en el tratamiento de la enfermedad, el RMS no metastático presenta un pronóstico favorable. Sin embargo, debido a que en el momento del diagnóstico, un 15% de los RMS presentan metástasis, la tasa de curación de estos pacientes es extremadamente baja. Por esta razón es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la tasa de supervivencia de estos pacientes, así como para los de alto riesgo o para aquellos que presentan recidivas.

Una de las razones del fracaso terapéutico es el desarrollo de resistencia al tratamiento antitumoral por parte de las células de RMS metastático.

Tradicionalmente, la investigación del fenómeno de quimiorresistencia ha estado principalmente enfocada al estudio de las células tumorales. Sin embargo, se ha demostrado que el microambiente tumoral también es un factor determinante de quimiorresistencia. En este sentido, es necesario resaltar el papel fundamental que desempeñan los factores de crecimiento (FC) en la biología tumoral y en la formación de metástasis debido a que controlan funciones críticas de las células tumorales, tales como la proliferación, la neoangiogénesis y la inhibición de la apoptosis.

De hecho, debido a la capacidad de los FC para modular la sensibilidad de las células tumorales a los agentes citotóxicos, dichos factores se han propuesto como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales, tanto

como agentes individuales, como en combinación con quimioterápicos convencionales.

En otros modelos tumorales, se han utilizado agentes inductores de la diferenciación para revertir el efecto protumoral de los FC. Estos agentes inductores de la diferenciación podrían también aumentar la eficacia del tratamiento convencional del RMS.

Los objetivos del presente trabajo de investigación son, en primer lugar, analizar la posible influencia de diferentes FC sobre la actividad biológica de las células de RMS y sobre el efecto de la quimioterapia convencional sobre estas células.

En segundo lugar, analizar la influencia del agente inductor de la diferenciación ácido *all trans* retinoico (ATRA) sobre la posible reversión del efecto protumoral ejercido por los FC y sobre la eficacia de la quimioterapia.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. LOS SARCOMAS DE PARTES BLANDAS

II.1.1. Concepto

Los sarcomas denominados *de partes blandas* (SPBs) engloban a un grupo heterogéneo de tumores primarios mesenquimatosos que se localizan fuera del esqueleto y de los órganos parenquimatosos. Constituyen menos del 1% de todas las neoplasias en adultos y un 15% de las neoplasias malignas pediátricas y se han identificado hasta el momento más de 50 tipos histológicos diferentes (Hogendoorn *et al*, 2004; Winette TA *et al*, 2012; Tabla 1). Estos tumores pueden surgir en cualquier parte del cuerpo, pero se desarrollan sobre todo en las extremidades, en la cintura y en el abdomen. La tasa de supervivencia a 5 años es de aproximadamente del 50% al 60% en los adultos y el 75% en los niños, dependiendo de grado de desarrollo del tumor, su tamaño, profundidad, localización y subtipo histológico (Riedel *et al*, 2012).

II.1.2. Etiología y tipos

Los SPBs no tienen una etiología definida, aunque se han identificado múltiples factores asociados que podrían predisponer a la aparición de estos tumores.

- Factores genéticos: los SPBs ocurren con más frecuencia cuando se padece la enfermedad de Von Recklinhausen, el síndrome de Li-Fraumeni (produce mutaciones en el gen supresor de tumores p53), el síndrome de Werner, neurofibromatosis, esclerosis tuberosa del gen retinoblastoma, linfedema crónico y poliposis adenomatosa familiar.
- Factores ambientales: como la exposición a radiaciones ionizantes y a algunos agentes químicos como los ácidos fenoxiacéticos (presentes en herbicidas), las digoxinas y los clorofenoles (conservantes de la madera) se han implicado en su etiología (Vasallo *et al*, 2003; Okcu *et al*, 2011).

II. Introducción

El comportamiento clínico de la mayoría de los SPBs se correlaciona con su localización anatómica, grado histológico y tamaño del tumor (Cormier *et al*, 2004). Además, la vía metastática más comúnmente aceptada es la hematógica, siendo los pulmones el principal órgano diana. Por el contrario, son muy raras las metástasis producidas por vía linfática (<5%).

Sin embargo, la variabilidad en los resultados clínicos obtenidos hasta el momento, recalca la heterogeneidad en cuanto a la agresividad biológica de estos tumores, por lo que encontrar el tratamiento terapéutico más adecuado para cada tipo de tumor es uno de los grandes retos de la oncología (Mocellin *et al*, 2006).

Tabla 1. Tipos histológicos de sarcomas de partes blandas en función del tejido afecto (adaptada de Hogendoorn *et al*, 2004).

Tipo del tejido	Tumor
Óseo	Osteosarcoma extraóseo
Cartilaginoso	Condrosarcoma mixoide extraóseo Condrosarcoma mesenquimatoso extraóseo
Fibroso	Fibrosarcoma Dermatofibrosarcoma
Fibrohistocítico	Histiocitoma fibroso maligno
Sinovial	Sarcoma sinovial
Graso	Angiosarcoma Linfangiosarcoma Hemangiopericitoma maligno
Nervioso	Liposarcoma
Muscular	Leiosarcoma Rabdomiosarcoma
Vascular	Angiosarcoma
Piel/Dermis	Sarcoma de células claras Carcinoma celular escamoso
Varios tipos de tejido	Mesenquioma maligno
Desconocido	Sarcoma epitelioides Sarcoma alveolar de partes blandas Sarcoma de Ewing Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas

El grado histológico en los SPBs tiene una gran relevancia pronóstica, debido a la relación de éste con la afectación ganglionar; el pronóstico varía mucho en función del grado histológico, invasión, el tamaño del tumor, resecabilidad, el uso de la radioterapia, el sitio del tumor primario y la presencia de metástasis (Ferrari et al, 2005). Se ha observado que la incidencia en la afectación ganglionar está en gran medida relacionada con el grado histológico de malignidad, siendo los sarcomas epitelioides (con una tasa de afectación del 80%), los sarcomas de origen vascular (40%) y los rabdomiosarcomas (36%), los que se asocian con la tasa más alta de afectación ganglionar.

La mayoría de los SPBs se caracterizan por una resistencia relativa a la quimioterapia y la tasa de supervivencia a los 5 años suele ser del 50-60% (Brennan *et al*, 2001). Sin embargo y a pesar de los intentos de mantenimiento de un control local del tumor en el órgano afectado mediante la aplicación de terapias multidisciplinarias, se siguen produciendo recurrencia y metástasis, lo cual provoca que la tasa de supervivencia a los 5 años no supere el 15% en pacientes con SPBs de alto riesgo (con un perfil metastático, localización profunda, en el tronco o cabeza y cuello, tamaño superior a 5 cm y grado histológico intermedio o alto; Grupo GEIS, 2006; Figura 1 y Tabla 2).

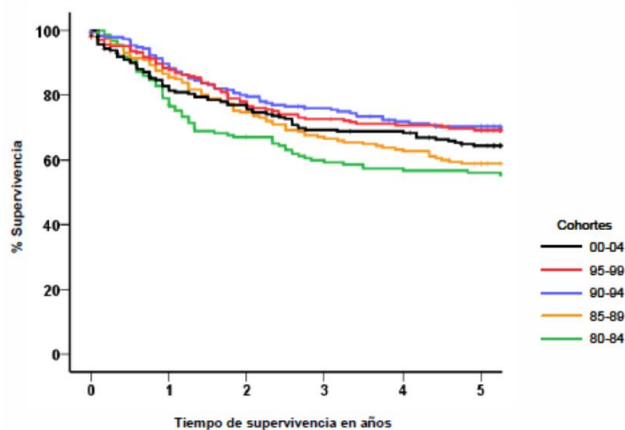


Figura 1. Tumores de tejidos blandos. Supervivencia a 5 años del diagnóstico por cohortes en España. Periodo 1980-2004 (Informe RNTI-SEOP 2009. Peris-Bonet *et al*, 2010).

II. Introducción

Tabla 2. Clasificación de los tipos histológicos de SPB en el momento del diagnóstico (adaptado de OMS, 2013).

Tumores adipocíticos	Liposarcoma mixoideo bien diferenciado
Tumores Condro-óseos	Condrosarcoma extraesquelético Osteosarcoma extra-esquelético
Tumores fibroblásticos / Miofibroblásticos	Tumor desmoide (o fibromatosis agresiva) Fibrosarcoma Tumor myofibroblástico inflamatorio Sarcoma fibromixoide de grado bajo Mixofibrosarcoma, de bajo grado. Fibrosarcoma epitelioides esclerosante
Tumores del músculo esquelético	Rabdomiosarcoma (embrionario, alveolar y formas pleomórficas)
Tumores del músculo liso	Leiomyosarcoma
Tumores fibrohistiocitarias	Tumor plexiforme fibrohistiocítico Sarcoma pleomórfico indiferenciado Histiocitoma fibroso maligno
Tumores de los nervios periféricos	Tumor maligno de la vaina del nervio periférico
Tumores de diferenciación incierta	Sarcoma alveolar de partes blandas Sarcoma de células de partes blandas Pequeño tumor desmoplásico de células redondas Sarcoma epitelioides Tumor rabdoide extrarrenal
Tumores de diferenciación incierta	Condrosarcoma mixoide extraesquelético Tumor neuroectodérmico primitivo/extraesquelético Tumor de Ewing Sarcoma sinovial Sarcoma indiferenciado; Sarcoma, sin otra especificación
Tumores vasculares	Angiosarcoma Hemangioendotelio epitelioide Hemangiopericitoma (infantil)

Sin embargo, se han realizado grandes avances respecto a la biología de este tipo de tumor, de forma que las terapias se dirigen hacia las dianas moleculares y específicas de las células que componen el SPB, lo que puede cambiar la historia natural de esta enfermedad (Fletcher *et al*, 2004). En la actualidad, se encuentran en fase de ensayo clínico:

- Cediranib
- MLN8237
- Cixutumumab y Temsirolimus
- Gemcitabina y docetaxel
- Trabectedina

Y se está trabajando en nuevos regímenes de tratamientos quimioterápicos.

II.2. EL RABDOMIOSARCOMA

II.2.1. Concepto e incidencia

El rabdomiosarcoma (RMS) es el SPB más comúnmente encontrado en niños y jóvenes. Fue identificado por vez primera por Webner en 1854 y se trataba de un paciente de 21 años con un tumor lingual (Merlino *et al*, 1999). Constituye el 4-5% de las enfermedades oncológicas infantiles con una incidencia anual de 5.3 enfermos por millón de niños con edad inferior a los 15 años (Pascual *et al*, 2005).

El pico de incidencia en la infancia se produce a la edad media de 5 años, con un mayor porcentaje de afectación en el género masculino llegando a valores del 60% del total de enfermos (Breitfel *et al*, 2005; Barlow JW *et al*, 2006). En España, presenta una incidencia de alrededor del 8% de todos los cánceres en niños menores de 15 años y el 6% de los tumores sólidos pediátricos. Es más frecuente entre los varones y presenta dos etapas cronológicas de mayor incidencia; la primera y más importante entre el primero y séptimo año de vida y la segunda durante la adolescencia (Peris-Bonet *et al*, 2010; Figura 2).

Se cree que el origen del RMS se halla en un desequilibrio entre la proliferación y la diferenciación de células precursoras durante el programa miogénico del músculo esquelético (Li *et al*, 2009). La histología de estas neoplasias es análoga a la miogénesis del embrión en desarrollo, lo que nos da pistas acerca de la biología de estos tumores. Por esta razón, es más correcto definir el RMS como un tumor derivado del mesénquima primitivo que exhibe una profunda tendencia a la miogénesis que definirlo como un tumor originado en el músculo esquelético (Parham *et al*, 2001).

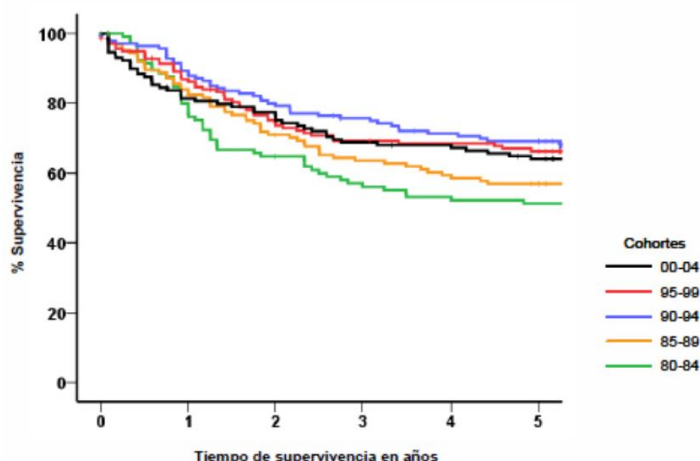


Figura 2. Rhabdomyosarcoma. Supervivencia a 5 años del diagnóstico por cohortes en España. Periodo 1980-2004 (Informe RNTI-SEOP 2009. Peris-Bonet *et al*, 2010).

II.2.2. Etiología

Puesto que el RMS deriva de las células mesenquimales primitivas, se puede desarrollar en cualquier zona del cuerpo, incluidas aquellas en las que no se encuentra normalmente músculo estriado. Los lugares donde se localiza preferentemente se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Localización del tumor primario y vías de diseminación (adaptado de Breitfeld *et al*, 2005).

Localización primitiva	Frecuencia relativa %	Afectación Regional	Metástasis a distancia
Cabeza y Cuello:	7		
Órbita	8	Ganglionar (rara)	Pulmonares (raras)
Parameningea	24	SNC (50%)	Pulmonares, óseas
Tracto Genitourinario:	29	Ganglionar (rara)	Pulmonares, médula
		Ganglionar (rara)	Ganglionares
Paratesticular	13	Ganglionar retroperitoneal	(retroperitoneales)
			Pulmonares, óseas
Extremidades:	15	Ganglionar	Pulmonares, óseas, médula, SNC
Otras:	4	Ganglionar (rara)	Pulmonares, óseas, hepáticas

II.2.3. Tipos histológicos

Los RMS se clasifican en dos grandes grupos dependiendo de su pronóstico: el grupo histológico favorable, en el que se encuentra el RMS embrionario (ERMS) con sus dos variantes y el grupo histológico desfavorable, que comprende el RMS alveolar (ARMS). A éstos, se les ha añadido recientemente un tercer tipo, el RMS pleomórfico (PRMS), que se presenta principalmente en adultos (National Cancer Institute, US, 2005; Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de las diferentes clasificaciones de los rhabdomyosarcomas. SIOP, International Society for Pediatric Oncology; NCI, National Cancer Institute (adaptado de Parham *et al*, 2006, revisado 2013).

Horn-Enterline	Palmer	SIOP	NCI	Internacional
Embrionario	Mezclado	Embrionario	Embrionario	Embrionario
	Tipo A	Denso, bien diferenciado	Leiomiomatoso	Célula huso
		Denso, poco diferenciado		
		Sin especificar		
		Blando, no botrioide	Botrioide	
Botrioide	Anaplásico	Blando, botrioide	Embrionario pleomórfico	Botrioide
Alveolar	Células redondas mono mórficas	Alveolar	Alveolar	Alveolar (Incluidas variantes sólidas)
	Anaplásico			
	Mixto?			
Pleomórfico	Anaplásico	Pleomórfico	Variantes sólidas Pleomórfico	RMS, Sarcoma no identificado
				Sarcoma indiferenciado no identificado

II.2.3.1. RMS embrionario (ERMS)

Es el más común (80%) y se presenta sobre todo en cabeza y cuello, vejiga, vagina, en zonas adyacentes a la próstata y en los testículos, así como en menor medida en las extremidades. Afecta principalmente a niños de corta edad.

Las células que forman este tumor recuerdan a las que se encuentran en desarrollo en un feto de 6-8 semanas. Con frecuencia muestran pérdida del material genómico específico en el brazo corto del cromosoma 11. La pérdida uniforme de

material genómico en la región del cromosoma 11p15 sugiere la presencia de un gen supresor de tumores, aunque dicho gen no ha sido aún identificado. Asimismo, son relativamente comunes (36%) los puntos de interrupción que involucran la región 1p11-1q11. (Gordon *et al*, 2001). Histológicamente, estos tumores se asocian con enfermedades de duración limitada y pronóstico favorable (figura 3). Se dan dos variantes del ERMS, botrioide y fusiforme:

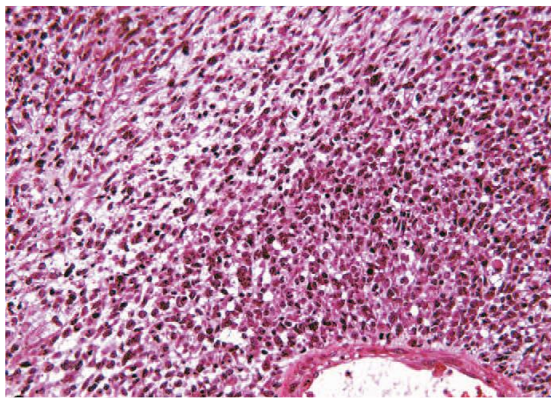


Figura 3. RMS embrionario (Parham *et al*, 2006).

II.2.3.1.1. ERMS Botrioide

Representa el 6% del total de ERMS y se desarrolla normalmente como una protrusión con forma de uva en los órganos mucosos (nasofaringe, vagina, vejiga...) mostrando condensación subepitelial (Figura 4).

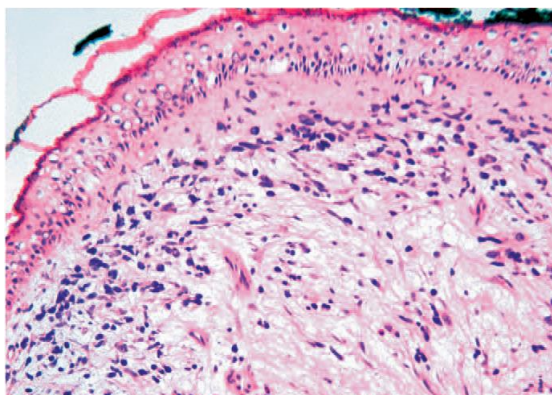


Figura 4. RMS botrioides (Parham *et al*, 2006).

II.2.3.1.2. ERMS Fusiforme

Representa el 8% del total de ERMS y se caracteriza por presentar células en forma de huso que se observan principalmente en la zona paratesticular (Figura 5).

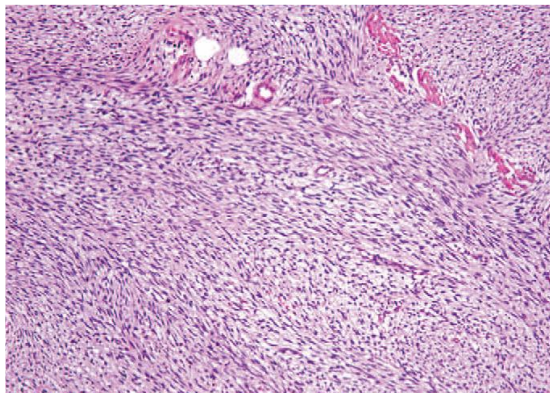


Figura 5. RMS fusiforme (Parham *et al*, 2006).

II.2.3.2. RMS alveolar (ARMS)

Aparece en el 15% de los casos, sobre todo en los músculos largos del tronco, brazos y piernas y afecta a niños de mayor edad. Se denomina alveolar porque las células se disponen dejando espacios huecos o alvéolos. Estas células recuerdan a células musculares normales presentes en un feto de 10 semanas

(Figura 6). Las traslocaciones entre el gen FOXO1 (anteriormente llamado FKHR) en el cromosoma 13 y el gen PAX3 en el cromosoma 2 (t (2; 13) (q35; q14)) o el gen PAX7 en el cromosoma 1 (t (1; 13) (p36; q14)) se encuentran en el 70% a 80% de los pacientes con tumores de histología alveolares (Barr *et al*, 2006; Dumont *et al*, 2012) los desplazamientos que implican al gen PAX3 se presentan en aproximadamente el 59% de los casos de ARMS, mientras que el gen PAX7 parece estar implicado en alrededor del 19% de los casos. Los pacientes con la variante sólida, presentan una incidencia menor de las fusiones genéticas PAX-FOXO1 que los pacientes que muestran una histología alveolar clásica (Parham *et al*, 2007).

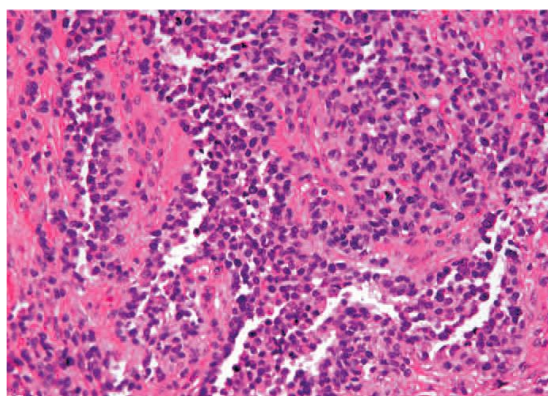


Figura 6. RMS alveolar (Parham *et al*, 2006).

II.2.3.3. RMS pleomórfico (PRMS)

Se trata de una variedad rara de RMS presente únicamente en individuos adultos constituyendo un 5% del total de casos de RMS. Se presenta principalmente en los pacientes entre 30 y 50 años de edad, y difícilmente se observa en niños. En los niños el término *pleomórfico* ha sido sustituido por el término *anaplásico* (Figura 7).

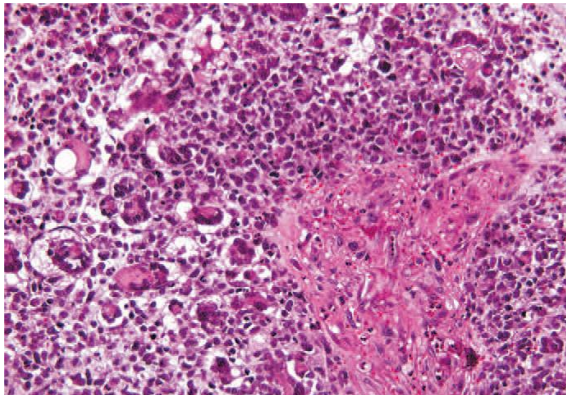


Figura 7. RMS pleomórfico o anaplásico (Parham *et al*, 2006).

II.2.4. Expresión citogenética del rhabdiosarcoma

Aunque la etiología del RMS es bastante desconocida, muchos tumores aparecen de forma espontánea, sin que exista una predisposición por factores de riesgo asociados. Las células de RMS muestran muchos defectos en los puntos de control del ciclo celular y las vías de señalización de los factores de crecimiento, lo que lleva a la proliferación acelerada, típicamente en la transición G1-S. Asimismo, se ha asociado la presencia de alteraciones genéticas con el proceso de rhabdiosarcomagénesis. La aparición del tumor puede estar originada por diferentes causas:

1. Elevada expresión de los inductores del ciclo celular como cyclin D (Zhang *et al*, 2004), CDK4 (Ragazzini *et al*, 2004), y Skp2 (Zhang y Wang *et al*, 2007).
2. Represión de los reguladores del ciclo celular como p16Ink4a (Iolascon *et al*, 1996; Obana *et al*, 2003), p21 (Moretti *et al*, 2002), p27 (Zhang y Wang *et al*, 2003), y p57 (Roeb *et al*, 2007).
3. Desregulación de las vías de señalización de los factores de crecimiento. Las vías más frecuentemente afectadas son las de IGF, FGF, HGF, y PDGF. Esta desregulación de FGF y HGF está ligada a un incremento de su capacidad invasiva y metastática (Taulli *et al*, 2006; Taylor *et al*, 2009). Este efecto se realiza a través de PAX3-FKHR que induce la actividad transcripcional de los genes de los receptores correspondientes, IGFR1, FGFR4, c-met y PDGFαR (Epstein *et al*, 1996; Ayalon *et al*, 2001; Cao *et al*, 2010). La capacidad de PAX3-

FKHR de dirigirse tanto a los puestos de control del ciclo celular como a las vías de señalización mitogénicas contribuye a la agresividad del RMS.

4. Defectos de Diferenciación. La miogénesis se produce a través de una cascada ordenada de eventos que implican a la familia de factores de regulación miogénica (MRF) y el factor potenciador-2 de miocitos (MEF2) (Pownall *et al*, 2002). Aunque las células de RMS expresan MyoD, miogenina, y MEF2, se mantienen inactivos. Recientes estudios sugieren que el incremento de la señalización de FGF y TGF inhibe MRF y MEF2.
5. Sobre-expresión de miostatina y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1), miembros de la superfamilia TGF, en las células de RMS. HGF puede inducir la expresión de la miostatina en condiciones normales de las células musculares (Yamada *et al*, 2010), a través del receptor de HGF (C-met) que, con frecuencia, se halla sobre-expresado en estas células. La miostatina y TGFβ1 inhiben la miogénesis a través de MyoD y MEF2, respectivamente (Liu *et al*, 2004; Yamada *et al*, 2010; Tabla 5).

Tabla 5. Alteraciones genéticas presentes en el RMS (adaptado de Xia *et al*, 2002).

Vías de señalización	Componente	Mutación	Locus	Subtipo	Frecuencia
P53	Tp53	Puntual	17p13.1	ARMS	1/17
				ERMS	4/36
	MDM2	Amplificación	12q13-15	ARMS	¼
				ERMS	2/6*
RB	CDK4	Amplificación	12q13-15	ARMS	**
				ERMS	2/6
	CDKN2A/B	Deleción	9q21	ERMS	2/6
RAS	KRAS2	Puntual	12q12.1	ERMS	2/14
	HRAS	Puntual	11q15.5	ERMS	2/8
	NRAS	Puntual	1q13.2	ERMS	3/14
MYCN	MYCN	Amplificación	2p24	ARMS	20/53

*Datos basados en la deleción de CDKN2A/B. **Amplificación detectada en la línea celular de ARMS RH30.

II.2.5. Clasificación clínica

Se han conformado diferentes sistemas de estadiaje para clasificar los RMS y poder programar el tratamiento más adecuado según la prognosis esperada. Los sistemas más ampliamente utilizados son el estadiaje *Tumor node metastasis* (TNM; que tiene en cuenta la localización del tumor primario, su diámetro mayor, la afectación de estructuras vecinas, las características de los ganglios linfáticos y la presencia de metástasis) y el sistema de los grupos *Intergroup rhabdomyosarcoma studies* (IRS; basado en la cantidad de tumor residual tras la cirugía inicial y el grado de diseminación tumoral en el momento del diagnóstico). Existe una tercera opción liderada por el grupo cooperativo europeo, que asigna a los pacientes protocolos de tratamiento mediante el uso de un esquema de clasificación que combina los sistemas anteriores agrupándolos según el riesgo (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación TNM (adaptado de Hayes-Jordan *et al*, 2009).

Término	Definición
Sitio favorable	Órbita; cabeza y cuello no parameningeo; tracto genitourinario que excluye los riñones, vejiga y próstata; conducto biliar.
Sitio no favorable	Cualquier sitio aparte de los favorables.
T1	Tumor limitado al sitio anatómico de origen.
T2	Tumor diseminado o fijado al tejido circundante.
A	Tumor ≤ 5 cm en su mayor diámetro.
B	Tumor > 5 cm en su mayor diámetro.
N0	No hay compromiso clínico de ganglios linfáticos regionales.
N1	Compromiso clínico de ganglio linfático regional.
NX	Ganglios linfáticos no regionales no examinados; no hay información.
M0	Enfermedad no metastática.
M1	Enfermedad metastática.

La estadificación del RMS es relativamente compleja (Tabla 7). El proceso incluye los siguientes puntos:

1. Asignar un estadio (tomar en cuenta la localización, tamaño, grupo quirurgicopatológico y la presencia o ausencia de metástasis).
2. Asignar a un grupo el tumor local quirurgicopatológico (estado posquirúrgico resecado/biopsia con evaluación patológica de los márgenes tumorales).
3. Asignar un grupo de riesgo (clasificado por estadio, grupo e histología).

Tabla 7. A) Estadificación del RMS; B) Grupos de riesgo del RMS; C) Grupos patológicos del RMS (adaptado de Raney *et al*, 2011).

Estadio	Localización tumor primario	Estadiaje T	Tamaño del tumor	Nódulos linfáticos regionales	Metástasis a distancia
1	Sitio favorable	T1 o T2	Cualquiera	N0 o N1 o NX	M0
2	Sitio no favorable	T1 o T2	A	N0 o NX	M0
3	Sitio no favorable	T1 o T2	A	N1	M0
			B	N0 o N1 o Nx	M0
4		T1 o T2	Cualquiera	N0 o N1 o Nx	M1

Grupo de riesgo	Histología	Estadiaje	Grupos
Bajo	Embrionario	1	I, II, III
	Embrionario	2, 3	I, II
Intermedio	Embrionario	2, 3	III
	Alveolar	1, 2, 3	I, II, III
Alto	Embrionario o alveolar	4	IV

Grupo	Incidencia	Definición
I	13% aprox	Tumor localizado, completamente eliminado con márgenes microscópicamente claros y sin compromiso de ganglios linfáticos regionales. Se recomienda biopsia de ganglios linfáticos si existe sospechosa de afectación.
II	20% aprox	Tumor localizado, eliminado por completo con: (a) enfermedad microscópica en el margen, (b) la enfermedad regional, ganglios linfáticos regionales eliminados sin enfermedad microresidual, o (c) enfermedad regional con ganglios afectados, eliminados pero con enfermedad microscópica residual y / o implicación histológica del nodo más distal desde el tumor primario.
III	48% aprox	Tumor localizado, eliminado por completo con enfermedad residual grave después de: (a) biopsia, o (b) resección macroscópica del tumor primario (> 50%).
IV	18% aprox	Metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Esta categoría incluye: (a) prueba radiológica de la extensión del tumor, y (b) células tumorales positivas en el líquido cefalorraquídeo, fluidos pleurales, o peritoneal, o metástasis en estas regiones.

II.2.6. Diagnóstico

El diagnóstico del RMS se basa en la identificación de características específicas del linaje de células musculares, que consiste en la identificación del entrecruzamiento de estrías característico del músculo esquelético por microscopía óptica o electrónica y suele tardar en realizarse debido a la falta de síntomas o porque la aparición suele coincidir con una lesión reciente; sin embargo, es muy relevante la realización de un diagnóstico temprano, puesto que se trata de tumores agresivos con una alta capacidad metastática.

Además, el marcaje inmunohistoquímico de la expresión de proteínas musculares específicas, de marcadores de diferenciación de músculo esquelético como α -actina, la cadena pesada de la miosina, desmina, mioglobina, proteínas de la banda Z y MyoD, son muy apropiadas para la confirmación del diagnóstico (Newton *et al*, 1995; Merlino *et al*, 1999).

Recientemente se ha comenzado a valorar el mapeo genético para ayudar en la diferenciación de los tipos de RMS, dada la limitación histopatológica actual.

Así, se cree que el origen de estos tumores está en un desequilibrio entre la proliferación y la diferenciación de las células precursoras durante el programa esquelético miogenético (Li *et al*, 2009).

Tras realizarse el diagnóstico de RMS, se debe llevar a cabo una evaluación para determinar el grado de extensión de la enfermedad antes de instituir el tratamiento. Esta evaluación debe incluir una radiografía de tórax, una exploración torácica mediante tomografía computerizada (TC), aspiración bilateral de médula ósea y biopsias, exploración ósea, imágenes por resonancia magnética de la base del cráneo y el cerebro (para casos de tumores primarios parameningeos solamente), y una exploración mediante TC del tórax y la pelvis (para los tumores de las extremidades inferiores o genitourinarios primarios).

Se debería tomar en cuenta una exploración por TC de los ganglios linfáticos regionales. Los ganglios linfáticos dilatados se deben someter a biopsia. Un estudio ha mostrado que las biopsias de los ganglios linfáticos centinelas se puede llevar a cabo de forma inocua en niños con RMS y las biopsias positiva al tumor podrían alterar el plan de tratamiento (Kayton *et al*, 2008). Las tomografías por emisión de positrones (PET) con fluorodeoxiglucosa 18 (¹⁸FDG) pueden identificar áreas de enfermedad metastática que no se pueden ver mediante otras modalidades (Völker *et al*, 2007). Sin embargo la eficacia de estos dos procedimientos de identificación de ganglios linfáticos implicados u otros sitios, se encuentra bajo evaluación.

La metodología indicada por el National Cancer Institute de USA, vigente desde 2005 y que se utiliza para el diagnóstico del RMS comienza con una biopsia (para determinación del grado histológico) y continúa con el análisis de sangre u orina a los que se deben poder realizar estudios por TC, resonancia magnética nuclear, ecografía y gammagrafía ósea.

A continuación se realizará la aspiración o biopsia de la médula ósea (para determinar la cantidad, tamaño y madurez de las células sanguíneas o la presencia

de células anormales); una punción lumbar (para medir la presión del conducto raquídeo y del cerebro, para análisis del líquido cefalorraquídeo en busca de células anormales o infecciones) y una inmunohistoquímica (para confirmar la enfermedad y el tipo de tumor mediante la determinación de marcadores específicos del RMS; Tabla 8).

Tabla 8. Marcadores inmunohistoquímicos útiles para el diagnóstico del RMS (adaptado de Parham *et al*, 2006).

Tipo	Marcador
Citoplasmático no filamentoso	Mioglobina
	Creatin kinasa M
Citoplasmático filamentoso	Desmina
	Actina muscular específica
	Miosina sarcomérica
Nuclear	MioD
	Miogenina

Por último, se procederá a elaborar estudios citogenéticos (para determinar aberraciones cromosómicas típicas en estos tumores, como son las translocaciones en el ARMS) así como técnicas moleculares (PCR para la detección de la expresión de genes de fusión como los que ocurren en la variante más agresiva del RMS, el ARMS).

II.2.7. Tratamiento

Se considera posible que todos los pacientes con RMS tengan micro-metástasis en el momento del diagnóstico, de tal forma que es necesario aplicar una terapia multimodal que incluye la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Las pautas de los tratamientos y su intensidad deben ser planificadas dependiendo de los factores pronósticos (grupos de riesgo) y los efectos secundarios que se producen en el paciente.

Sin embargo, se opta por un enfoque conservador del tratamiento, de forma que se produzca el mínimo trauma sobre los órganos y tejidos del paciente, teniendo en cuenta el efecto que tiene la quimioterapia sobre la disminución del tamaño tumoral (Breitfeld *et al*, 2005; Gallego *et al*, 2006).

Las recomendaciones para el tratamiento del RMS difieren en el enfoque terapéutico. Así, existen diferentes grupos, como el Comité de Sarcomas de Partes Blandas (*Soft Tissue Sarcoma Comitee* [COG-STS]) del Grupo de Oncología Infantil (*Children Oncology Group*, [COG]) que realiza ensayos del *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group* (IRSG), y la Sociedad Internacional de Pediatría Oncológica de Tumores Malignos Mesenquimales, que realizan ensayos en Europa del TMM Group (Stevens *et al*, 2005).

En los ensayos del grupo TMM, la estrategia terapéutica es utilizar quimioterapia inicial seguida de resección quirúrgica y reservar la radioterapia para casos de resección incompleta, compromiso documentado de ganglios linfáticos regionales, o mala respuesta clínica a la quimioterapia inicial. Este enfoque está diseñado para evitar procedimientos quirúrgicos mayores y efectos perjudiciales a largo plazo de la radioterapia.

La estrategia terapéutica del COG-STS ha sido el tratamiento quirúrgico en primera instancia, seguido de radioterapia inmediatamente después, en pacientes con enfermedad residual. El objetivo es prolongar el período de supervivencia libre de enfermedad, tratando de evitar las recaídas y la terapia de rescate posterior (Donaldson *et al*, 2005).

La estrategia terapéutica TMM ha obtenido supervivencias libres de enfermedad del 71% en comparación con el 84% de la estrategia IRSG. Del mismo modo, las tasas de supervivencia a los 5 años fueron del 57% para el TMM frente al 78% en el IRSG.

II.2.7.1. Cirugía

La cirugía es importante en el tratamiento del RMS. Para tumores localizados en zonas fácilmente accesibles, la escisión completa del tumor antes de comenzar la quimioterapia aumenta sensiblemente las posibilidades de éxito en el tratamiento. Sin embargo, la utilización de la cirugía se verá limitada cuando la localización del tumor no lo permita o signifique la pérdida de función de un órgano (vejiga) o parte del cuerpo (amputaciones de extremidades) (Martelli *et al*, 1999; Arndt *et al*, 2001).

Además, la cirugía es importante para determinar la afectación de los ganglios linfáticos, sobre todo en RMS paratesticular o de extremidades. Por estos motivos, la exploración quirúrgica de los ganglios regionales (o del ganglio centinela) es un procedimiento estándar en pacientes con RMS en extremidades. La determinación de la presencia de ganglios afectados es muy relevante, puesto que estos pacientes requieren de radioterapia local (Mc Mulkin *et al*, 2003; Breitfeld *et al*, 2005).

II.2.7.2. Radioterapia

La utilización de radioterapia para el control local y regional del tumor es un recurso habitual en el tratamiento del RMS (Breitfeld *et al*, 2005). La forma de aplicación (externa, braquiterapia) y las pautas más convenientes (prequirúrgica, intraoperatoria y posquirúrgica) están todavía por determinar, a pesar de los numerosos grupos cooperativos de trabajo a nivel internacional que trabajan para avanzar en el tratamiento del RMS.

La radioterapia posquirúrgica se plantea teniendo en cuenta el estadio del tumor, el estado en el que han quedado los márgenes quirúrgicos tras la escisión tumoral y los protocolos de tratamiento que desarrolla el centro sanitario en el que se encuentra el paciente. Por otro lado, la radioterapia prequirúrgica puede tener varias ventajas (O'Sullivan *et al*, 2003). Las células tumorales no tratadas se encuentran en un mejor nivel de oxigenación, lo que aumenta la efectividad de la

radiación. Por otra parte, los campos de radiación pueden ser menores que los que se aplican en la radioterapia posquirúrgica, lo que mejoraría la función de la zona afectada. Por último, la radioterapia puede facilitar la posterior cirugía disminuyendo previamente el tamaño tumoral. Sin embargo, la radioterapia prequirúrgica puede dificultar la determinación de los límites de resección y además puede disminuir la capacidad de cicatrización de la zona tratada (Mocellin *et al*, 2006).

Actualmente existe un gran consenso entre los grupos cooperativos en el siguiente hecho: los pacientes con tumores del grupo I (resecados completamente en la primera cirugía) y con una patología de pronóstico favorable (ERMS) tienen respuestas muy favorables sin radioterapia, es decir, mediante la cirugía y una quimioterapia complementaria. Sin embargo, los pacientes con tumores del grupo I pero de tipo histológico desfavorable (ARMS), en los que es más probable que aparezca una recidiva, y los que se clasifican en los grupos II, III y IV se tratan sistemáticamente con radioterapia, además de la cirugía y la quimioterapia complementaria.

La cirugía se utiliza para el diagnóstico de RMS, y para el control local, junto con la radioterapia, después de la quimioterapia. La quimioterapia se utiliza para el control sistémico de RMS no metastático, pero el RMS metastático requerirá nuevos enfoques (Wu *et al*, 2009).

II.2.7.3. Quimioterapia

La quimioterapia se utiliza para el tratamiento de todos los pacientes con RMS. La cantidad, tipo de fármacos y duración dependerá del análisis de los factores de riesgo. Puede tratarse de quimioterapia neoadyuvante (suministrada antes del proceso quirúrgico) o adyuvante (después de la cirugía). La modalidad de tratamiento dependerá del pronóstico de cada caso. En la actualidad, el tratamiento de primera línea está representado por la asociación de vincristina (VCR), ciclofosfamida y actinomicina-D (ACD) (National Cancer Institute US, 2008).

Pacientes de bajo riesgo (RMS en estadio 1, con el tumor completamente resecado, grupo I o con enfermedad microscópica residual, grupo II) y sin metástasis: para los pacientes con el pronóstico más favorable el objetivo del tratamiento es mantener altas las tasas de supervivencia (>90%) y al mismo tiempo reducir las consecuencias de la quimioterapia a largo plazo. Las combinaciones de fármacos más utilizadas en este caso son VCR+ACD con o sin radiación; o VCR+ACD+Ciclofosfamida con o sin radiación (Raney *et al*, 2011).

Pacientes con riesgo intermedio (ERMS con enfermedad residual macroscópica, grupo III; pacientes menores de 10 años con RMS metastático; ARMS no metastático): la tasa de supervivencia que se obtiene en estos pacientes varía entre el 55 y el 88%. La quimioterapia estándar para estos pacientes consiste en la terapia VAC con o sin Ifosfamida para el IRS-IV (Crist *et al*, 2001). No obstante se han estudiado otras opciones como la terapia VAC más topotecan y ciclofosfamida para el grupo COG (Walterhouse *et al* 2004); la terapia VCR+doxorubicina+etopósido (VDC) alternada con ifosfamida+etopósido (IE; Arndt *et al*, 2008) y la terapia Ifosfamida+VCR+ACD (IVA)+ carboplatino, epirrubicina y etopósido (Oberlin *et al*, 2012).

Pacientes de alto riesgo (con metástasis en el momento del diagnóstico): constituyen aproximadamente el 15% de los niños con RMS, cuyo pronóstico no ha mejorado significativamente en los últimos 15 años. La supervivencia total de estos pacientes no supera el 50%, aunque algunos grupos de tratamiento actuales han mejorado esa cifra (Rodeberg *et al*, 2005).

En el estudio IV del IRS se han utilizado dobles combinaciones de fármacos ifosfamida+doxorubicina (Sandler *et al*, 2001) o VCR+melfalán (Breitfeld *et al*, 2001) antes del tratamiento convencional con VAC, pero no se han obtenido mejoras significativas en la supervivencia (Brenemann *et al*, 2003).

Otro estudio liderado por el COG-STSS analizó el uso de irinotecan e irinotecan+VCR con similares resultados (Pappo *et al*, 2007).

En los estudios de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) dentro del grupo que estudia los tumores mesenquimales malignos (TMM), se han utilizado la intensificación de la terapia ifosfamida+VCR+adriamicina con melfalán a altas dosis como estrategia terapéutica para este grupo de pacientes. Sin embargo, la supervivencia total no ha mejorado con esta terapia múltiple, por lo que no se recomienda en el tratamiento del RMS metastático (Carli *et al*, 1999). En otro estudio se comparó una combinación estándar de seis fármacos seguido por un mantenimiento de VDC, frente al tratamiento con doxorrubicina como agente único o carboplatino, continuando con ciclos monoterapia a altas dosis de ciclofosfamida, etopósido y carboplatino y finalizando con terapia VAC, no observándose beneficio para el grupo de terapia de alta dosis (McDowell *et al*, 2010).

Pacientes con RMS recurrente: Aunque los pacientes con RMS recurrente a veces pueden lograr una remisión completa con terapia secundaria, su pronóstico a largo plazo es generalmente pobre (Mazzoleni *et al*, 2005). El pronóstico es más favorable (50% al 70% de tasa de supervivencia a 5 años) en niños que inicialmente presenten estadio 1 o Grupo I e histología embrionaria, y que tienen tumores pequeños y para aquellos que tienen una recurrencia local o regional ganglionar (Dantonello *et al*, 2008). La mayoría de los otros niños con recidiva tumoral, tienen un pronóstico extremadamente precario. Una revisión retrospectiva de los pacientes de RMS identifica el tiempo hasta la recurrencia como un importante factor pronóstico. Cuanto menor es el tiempo hasta la recurrencia mayor es el riesgo de mortalidad para el RMS recidivante (Mattke *et al*, 2009). También se han descrito: la recidiva metastática (en oposición a local), la terapia de radiación previa, el tamaño inicial del tumor (> 5 cm), y el tiempo hasta la recaída (<18 meses) como características de pronóstico desfavorables para la supervivencia después de la recidiva (Chisholm *et al*, 2011).

La selección de tratamiento adicional depende de muchos factores, incluyendo el sitio (o sitios) de recidiva, el tratamiento previo y consideraciones individuales del paciente. El tratamiento de la recidiva local o regional puede incluir escisión local amplia o la resección quirúrgica intensa del tumor, sobre todo en ausencia de metástasis ósea extendida (De Corti *et al*, 2011). La radioterapia debe ser valorada en pacientes que aún no han recibido radioterapia en el área de recurrencia, o para los que la exéresis quirúrgica no es posible.

La quimioterapia más comúnmente utilizada en el tratamiento del RMS recurrente es:

- Ifosfamida+carboplatino+etopósido (Van Winkle *et al*, 2005; Kim *et al*, 2012)
- Ciclofosfamida+topotecan (Saylor *et al*, 2001)
- Irinotecan con o sin VCR (Vassal *et al*, 2007; Mascarenhas *et al*, 2010)
- Vinorelbina como agente único (Kuttesch *et al*, 2009)
- Vinorelbina y ciclofosfamida (Casanova *et al*, 2004)
- Gemcitabina y docetaxel (Rapkin *et al*, 2012)
- Rapamicina (Houghton *et al*, 2008)
- Topotecan, VCR y doxorubicina (Meazza *et al*, 2009)

II.2.8. Supervivencia a largo plazo y esperanza de vida

El balance entre la curación y las secuelas irreversibles del tratamiento a largo plazo sigue siendo uno de los principales retos en el tratamiento del RMS pediátrico. Los efectos colaterales citotóxicos de la quimioterapia, como la supresión medular e inmune, se pueden controlar con las terapias actuales. Sin embargo, a medida que se incrementa la supervivencia, aumentan las secuelas a largo plazo: la toxicidad cardíaca asociada a la exposición a antraciclinas, la acidosis tubular renal derivada de la terapia con agentes como el carboplatino, la ifosfamida que también daña la función renal normal produciendo acidosis, además de la pérdida crónica de electrolitos por vía urinaria, el raquitismo renal y la osteoporosis. Además, la

ifosfamida puede también actuar en segunda instancia potenciada por la radioterapia reduciendo el nivel de fertilidad masculina.

La radioterapia puede inducir la formación de nuevos tumores diferentes del tratado, así como hipoplasia vascular y de los tejidos blandos. Además, provoca disfunciones en las extremidades, deterioro muscular e incluso efectos psicológicos que, dependiendo de la edad de administración (<3 años), puede ocasionar dificultades en el proceso de aprendizaje y evolución hacia la etapa adulta (McDowell *et al*, 2003).

La probabilidad de supervivencia a los 5 años depende en gran medida del tipo histológico. Así, dicha probabilidad de supervivencia, es del 64% en los pacientes con histología botrioide, del 26% en el caso de pacientes con ERMS y sólo del 5% para los de ARMS.

Entre los individuos con ERMS, el estadio inicial y la correcta asignación al grupo de riesgo determina a la probabilidad de supervivencia, variando ésta desde el 51% del estadio 1/grupo I al 12% del estadio 4/grupo IV. Para aquellos individuos clasificados en el estadio 1/grupo I, el tipo de recidiva (local, regional o distal) influye en la subsecuente probabilidad de supervivencia, siendo dicha probabilidad de supervivencia de un 72% para recidivas locales y de un 30% en recidivas distales.

Del mismo modo, los pacientes con histología alveolar recurrente incrementan sus probabilidades de supervivencia si se clasifican en el grupo I (40%) frente al resto de grupos (3%).

Por otra parte, para aquellos pacientes con RMS de histología alveolar, la clasificación, el tipo de recurrencia, la localización del tumor primario y el tratamiento, no ejercen ninguna influencia en la probabilidad de supervivencia (Womer *et al*, 2000; Tabla 9).

Tabla 9. Factores predictivos de supervivencia tras recidiva en RMS pediátrico en pacientes en estudios III, IVP y IV del IRS. Datos adaptados de Womer *et al*, 2000.

Categoría	Número de pacientes	Ratio de supervivencia estimada a 5 años tras recurrencia
Favorable	120*	51**
Botrioide (todos los estadios y grupos)	19	64
Embrionario (estadio I o grupo I)	85	52
Recurrencia local	34	72
Recurrencia regional	19	50
Recurrencia distal	26	21
Alveolar o indiferenciado (grupo I)	16	40
Desfavorable	485*	10**
Embrionario (estadio II/III, grupo II/III)	134	20
Embrionario (grupo IV)	94	12
Alveolar o indiferenciado (grupos II, III y IV)	257	3

*Número total de pacientes

**Ratio de supervivencia global

II.2.9. Nuevas estrategias terapéuticas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los grupos cooperativos de tratamiento del RMS y SPB (IRS, TMM, *Cooperative Weichteilsarkom* –CWS- y COG), el tratamiento de los pacientes con RMS continúa evolucionando y se adapta continuamente a los nuevos resultados, sin poder establecer una terapia estándar absoluta. Esta evolución de los tratamientos ha permitido mejorar la supervivencia en estas últimas décadas. En general, las combinaciones terapéuticas VAC e IVA, parecen tener una efectividad similar y pueden considerarse como las terapias de referencia para la mayoría de los RMS infantiles. A continuación, se relacionan las pautas ensayadas según el riesgo de recidiva:

Riesgo bajo: consiste en la administración de 4 ciclos de VAC seguidos de 36 semanas de terapia VA encaminado a reducir la exposición total de ciclofosfamida, manteniendo el excelente resultado de la terapia y reduciendo su morbilidad.

Riesgo intermedio: se están ensayando terapias VAC con topotecan/ciclofosfamida, basándose en la actividad del topotecán sobre el RMS por sí sólo o en combinación con la ciclofosfamida.

Riesgo intermedio-alto: se están ensayando terapias VAC con irinotecan/VCR (IV) tras una exposición previa a radiación, basándose en la actividad del irinotecán sobre el RMS por sí sólo o en combinación con la VCR.

Riesgo alto: tras una exposición inicial al IV, se analiza el tratamiento con combinaciones alternantes de VDC e IE. También se están testando temozolomida y cixutumumab en pacientes con RMS metastático.

Pacientes con recidiva: normalmente son los que peor pronóstico presentan y los ensayos comparan dos esquemas diferentes de administración de irinotecan (ambos junto con VCR [IV]). Los pacientes reciben ciclos estándar de 3 semanas alternantes entre VDC e IE. Los pacientes que no respondan al IV se tratarán con tirapazamina con ciclos de VDC. Otra opción la plantea la quimioterapia intensiva seguida de trasplante autólogo de médula ósea (Weigel *et al*, 2001), la monoterapia con vinorelbina (Casanova *et al*, 2002), la terapia combinada de vinorelbina y ciclofosfamida de dosis bajas (Casanova *et al*, 2004), rapamicina en solitario (Houghton *et al*, 2008) y topotecán, VCR y doxorubicina (Meazza *et al*, 2009). Otros fármacos en estudio son el ditartrato de vinorelbina y ciclofosfamida en combinación con bevacizumab o temsirolimus en el tratamiento de pacientes con RMS recurrente; sorafenib tosilato en el tratamiento de pacientes jóvenes con RMS recidivante y la quimioterapia intensiva seguida de trasplante autólogo de médula ósea (Admiraal *et al*, 2010; Peinemann *et al*, 2011). La gemcitabina ha sido estudiada como potencial quimioterápico en niños (Wagner-Bohn *et al*, 2006). Recientemente se ha descrito un estudio con gemcitabina y docetaxel con prometedores resultados en 19 pacientes pediátricos (Rapkin *et al*, 2012). Otro compuesto como la temozolomida también ha demostrado su interés terapéutico como agente único (De Sio *et al*, 2006) y en combinación con erlotinib (Jackaki *et al*,

2008); incluso el imatinib puede resultar muy adecuado, tal como demuestran estudios *in vitro* e *in vivo* (Taniguchi *et al*, 2008).

Es necesario mejorar la selección de los niños que pueden ser tratados con una terapia menos intensiva (VA+radioterapia) para evitar las secuelas de los agentes alquilantes y las antraciclinas a largo plazo. Por otro lado, el tratamiento local es una parte fundamental en el tratamiento del RMS, pero también deben ser tenidas en cuenta las secuelas a largo plazo de una cirugía o radioterapia muy agresiva. Aunque es posible curar un 30% de los pacientes sin la utilización de la radioterapia, es necesario mejorar los sistemas que permitan identificar a esta población de pacientes, de pronóstico favorable, en los que se pueden evitar los efectos secundarios de la radioterapia.

Gracias al conocimiento del perfil genético tumoral se pueden plantear terapias individualizadas, por lo que se están llevando a cabo importantes esfuerzos para que existan muestras de tejidos tumorales disponibles para dichas pruebas. Han sido identificados varios compuestos específicos cuya efectividad en la supresión del crecimiento y la tumorigénesis de RMS ha sido probada. Estos compuestos incluyen los inhibidores de los receptores de tirosin quinasa (Croze y Linardic *et al*, 2011), moléculas de señalización intracelular y de factores angiogénicos (Martins *et al*, 2011; Houghton *et al*, 2011). Éstos y otros estudios como los de los oligopéptidos CpG, inyecciones tumorales del virus del *Herpes simplex* oncolítico, análogos de rapamicina, vacunas frente a pequeños fragmentos peptídicos que invierten la fusión FAX3-FKHR, inhibidores de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico y ligandos que inducen la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral alfa (TRAILs), prometen incrementar las oportunidades para nuevas intervenciones en los pacientes afectos de RMS (Breitfeld *et al*, 2005).

En el campo de la radioterapia la utilización de emisión de partículas que actúen de un modo más preciso como los protones, o partículas más pesadas como el ion carbono, son algunos de los avances que permitirán un mayor control de la enfermedad tumoral y, a su vez, una reducción de la exposición indeseada de los tejidos sanos circundantes al tumor.

Un nuevo campo de exploración viene dado por la terapia inductora de diferenciación cuyo objetivo consiste en limitar la actividad proliferativa descontrolada del tumor a través del efecto inductor de la diferenciación. Las células de RMS han mostrado ser susceptibles a tales intervenciones terapéuticas abriendo una nueva vía de tratamiento frente al RMS.

Por último, cabe destacar el papel cada vez más importante que están adquiriendo los factores de crecimiento como el IGF, el HGF, el VEGF, etc, para el control del desarrollo tumoral, de modo que el bloqueo de la cascada enzimática que generan dichos factores en las células tumorales constituye una nueva estrategia terapéutica frente al RMS.

II.3. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento (FC) son moléculas de secreción paracrina o autocrina que regulan la proliferación, migración y muerte celulares. Su efecto viene dado por la presencia en la membrana celular de receptores específicos para dichas moléculas, que transmiten estas señales al interior celular desencadenando una cascada enzimática que finalmente deriva en su efecto biológico. Tanto las células normales como las células tumorales, que presentan en su mayoría alteraciones en los mecanismos de transducción de la señal, presentan receptores de membrana que responden a la presencia de dichos FC.

Los efectos biológicos desencadenados en las células tumorales, que incluyen la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis, la invasión y la metástasis, se ejercen a través de una red interconectada de vías de señalización celular formada por ligandos extracelulares de los FC, receptores transmembrana, protein quinasas intracelulares y factores de transcripción (Wen *et al* 2009). En los últimos años, los ensayos dirigen sus esfuerzos a la regulación de dichas vías de señalización intracelulares como mecanismo de control tumoral, con resultados prometedores.

El desarrollo de resistencia a la quimioterapia por las células tumorales constituye una limitación al tratamiento del cáncer. Aunque la investigación inicial se centró en las células tumorales, se ha observado que el entorno del tumor puede determinar también la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia. En los últimos años, se ha orientado la investigación de este área hacia los FC, dada su capacidad de reducir la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia. Por este motivo, se ha incrementado de forma notoria el arsenal terapéutico dirigido contra los FC, sus receptores o las vías de señalización de los mismos.

II.3.1. Factor de crecimiento hepatocitario (HGF/SF)

El HGF fue descubierto en 1984 como un factor indeterminado que estimulaba la proliferación de hepatocitos tras hepatectomía parcial (Nakamura *et al*, 1984).

En 1985, se describió un factor derivado de los fibroblastos con efectos sobre la motilidad celular, al que se denominó factor de movilidad (SF, del inglés *Scatter factor*). En 1989 fue purificado y secuenciada su composición aminoacídica (Nakamura *et al*, 1989), y se descubrió que los ADN complementarios (ADNc) que codificaban HGF y SF eran el mismo (Weidner *et al*, 1989; Furlong *et al*, 1991).

II.3.1.1. Estructura y Funciones biológicas

La forma biológicamente activa del HGF es un heterodímero compuesto por dos cadenas β , una de 69kDa y otra de 39kDa (Nakamura *et al*, 1989) y el gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 7q21-q23 (Seki *et al*, 1991).

La producción del HGF/SF se localiza entre otras, en células de Kupffer, células endoteliales, fibroblastos y adipocitos.

Sin embargo, su expresión ha sido descrita también en el páncreas, el intestino delgado, el tiroides, el cerebro y la glándula submaxilar salival en grandes cantidades, mientras que en el hígado, riñón, y bazo se producen niveles mucho más reducidos (Jiang *et al*, 1993).

Se ha descrito la participación fundamental del HGF en procesos como la embriogénesis y organogénesis (Birchmeier *et al*, 1998), la proliferación de hepatocitos (Borowiak *et al*, 2004), la motilidad celular, la estimulación de las células hematopoyéticas, el sinergismo con otras citoquinas (Sonnenberg *et al*, 1993), la regeneración tisular y la cicatrización de heridas.

En órganos dañados como el hígado, el riñón, y el corazón se encuentra sobreexpresado para favorecer la proliferación, la migración celular e inhibir la apoptosis (Michadopoulos *et al*, 1997).

II.3.1.2. Vías de señalización

El receptor del HGF, c-Met, fue clonado en 1984 (Bottaro *et al*, 1991). Se trata de un receptor transmembrana compuesto por dos cadenas, una α y otra β (Birchmeier *et al*, 2003) con actividad tirosina quinasa (TK) (Matsumoto *et al*, 1996). La unión de HGF a c-Met provoca la dimerización y autofosforilación de dos residuos de fosfotirosina de la subunidad β , que activa múltiples cascadas de señalización celular que regulan, entre otros, los siguientes efectos fisiológicos:

a) La motilidad celular, a través de GAB1 (*GRB2-associated binding protein-1*), DOCK1 (*dedicator of cytokinesis-1*) y FAK (*focal adhesión kinases*), que controla la formación de adhesiones focales, lo cual es un factor crucial en la motilidad celular tumoral (Birchmeier *et al*, 2003; Venepalli *et al*, 2013).

b) La tubulogénesis, mediante el reclutamiento de GRB2 (*growth factor receptor-bound protein-2*), que promueve la activación de Ras (*rat sarcoma virus oncogene*; Schaeper *et al*, 2000), lo que provoca la fosforilación de MEK1 (*MAPK/ERK kinase-1*), y la activación de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*; Delehedde *et al*, 2001; Venepalli *et al*, 2013).

c) La diferenciación, regulación citoesquelética y polaridad celular, con la intervención de Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) y CDC42 (*Cell division control protein 42*), que reorganizan el citoesqueleto celular y STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*), cuya fosforilación altera la transcripción nuclear y provoca cambios en la adhesión celular, proliferación y motilidad celulares necesarias para la diferenciación y especialización celulares (Schaeper *et al*, 2000; Gao *et al*, 2005; Venepalli *et al*, 2013).

d) La supervivencia, mediante la activación de JNK (*c-Jun kinase*), que activa c-Jun y c-Fos (Xiao *et al*, 2001). Esto hace que se expresen proteínas

como CDK6 (*cyclin dependent kinase-6*), Rb (retinoblastoma) y p27/p27KIP1 (*cyclin dependent kinase inhibitor p-27*), que regulan positivamente la progresión en el ciclo celular. Además, activa genes anti-apoptóticos como *cyclooxygenase-2* (COX2), que inhiben la apoptosis que se produce en las células epiteliales inducida por la pérdida de la unión a la matriz extracelular, proceso necesario para la homeostasis celular y tisular (Zeng *et al*, 2002). También a través de Akt, que actúa sobre la procaspasa 9 evitando que active la procaspasa 3, que regula la supervivencia celular (Delehedde *et al*, 2001).

e) La protección frente al daño en el ADN, a través de GAB1, Akt y *phosphatidil-inositol 3-kinase* (PI3K) que aumenta la reparación del ADN y reduce la apoptosis (Xiao *et al*, 2001).

f) La pérdida de las uniones intercelulares: a través de PI3K, Akt e I- κ - β -kinases (IKKs), que actúan sobre el NF- κ B (*necrosis factor kappa B*), el cual penetra en el núcleo y activa la transcripción de genes anti-apoptóticos (Delehedde *et al*, 2001). Además incrementan la cantidad de moléculas que estimulan la migración y la supervivencia celulares como PLC- γ (*phospholipase C-kinase*), IP3 (*inositol 1, 4, 5-triphosphate*), DAG (*diacylglycerol*), PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) y PKC (*protein Kinase-C*; Aoki M *et al*, 2001).

II.3.1.3. Implicación en el desarrollo tumoral

En el caso del RMS, se ha observado que dichas células tumorales no expresan el factor, pero sí expresan el receptor, lo cual las hace sensibles a dicho factor de crecimiento. De este modo, los genes que codifican al receptor se encuentran amplificados, mutados y sobre-expresados, lo cual se correlaciona con un pronóstico desfavorable de la enfermedad (Birchmeier *et al*, 2003; Tabla 10). A nivel tumoral, es esta sobre-expresión la que da lugar a efectos oncogénicos de tipo autocrino y paracrino, favoreciendo la proliferación tumoral y actuando como potente factor de supervivencia frente a la apoptosis y la muerte celular e induciendo la motilidad y la migración celulares y la angiogénesis, estimulando así los procesos de invasión y metástasis (Abounader *et al*, 2005).

Tabla 10. Expresión de HGF y pronóstico tumoral. Modificada de Birchmeier *et al*, 2003.

Categoría	Tipo de cáncer	Expresión HGF/SF	Expresión Met	Pronóstico desfavorable	Mutación Met
Carcinomas	Vejiga	Sí	Sí	Sí	No
	Mama	Sí	Sí	Sí	No
	Cervical	No	Sí	Sí	No
	Colagiocarcinoma	No	No	No	No
	Colorrectal	Sí	Sí	No	No
	Esofágico	No	Sí	No	No
	Gástrico	Sí	Sí	Sí	Sí
	Cabeza y Cuello	Sí	Sí	Sí	Sí
	Riñón	Sí	Sí	No	Sí
	Hígado	Sí	Sí	Sí	Sí
	Pulmón	Sí	Sí	Sí	No
	Nasofaríngeo	Sí	Sí	Sí	No
	Ovario	No	Sí	No	Sí
	Páncreas	Sí	Sí	No	No
	Próstata	Sí	Sí	No	No
	Tiroides	Sí	Sí	Sí	No
Sarcomas músculo esqueléticos	Osteosarcoma	Sí	Sí	No	No
	Sarcoma sinovial	Sí	Sí	No	No
Sarcomas tejidos blandos	MFH/Fibrosarcoma	Sí	Sí	No	No
	Leiosarcoma	Sí	Sí	No	No
	Sarcoma de Kasposi	Sí	Sí	No	No
Tumores hematopoyéticos	Mieloma múltiple	Sí	Sí	Sí	No
	Linfoma	Sí	Sí	No	No
	Leucemia de células T adultas	No	Sí	No	No
	Leucemia mielogénica aguda	Sí	No	No	No
	Leucemia mieloide crónica	Sí	No	No	No
Otros neoplasmas	Glioblastomas/ astrocitomas	Sí	Sí	Sí	Sí
	Melanoma	Sí	Sí	No	No
	Mesotelioma	Sí	Sí	No	No
	Tumor de Wilm	Sí	Sí	No	No

II.3.1.4. Estrategias terapéuticas

Las características fisiológicas y moleculares anteriormente descritas han focalizado los esfuerzos terapéuticos sobre las vías de señalización de la cascada enzimática del binomio HGF/c-Met, de modo que cualquier punto de la cascada se ha convertido en diana específica de un grupo de nuevos fármacos antitumorales.

Entre las diferentes terapias introducidas en los últimos años se pueden destacar las siguientes:

- a. Técnicas de silenciado génico: la utilización de U1snRNA y ribozimas, inhibe la expresión de HGF y c-Met (Abounader *et al*, 2005) reduciendo el crecimiento tumoral.
- b. NK4: este agente compite con el HGF por la unión a c-Met actuando a modo de antagonista del HGF, lo cual inhibe la proliferación, invasión y angiogénesis en diferentes líneas celulares (Jie *et al*, 2007; Wen *et al*, 2007).
- c. Moléculas inhibidoras de las tirosinkinasas: entre dichas moléculas se puede destacar al K252, que es responsable de la inhibición de la autofosforilación del receptor y por ende, de la activación de las MAP kinasas (Morotti *et al*, 2002); el PHA665752, que inhibe la fosforilación de c-Met (Christensen *et al*, 2003; Smolen *et al*, 2006); el LY294002, que actúa sobre PI3K; el PD98059, que actúa sobre la MAP quinasa [MAPK] y el PD180970 o el SU6656, que actúan sobre STAT (Sengupta *et al*, 2003; Song *et al*, 2003).
- d. Anticuerpos neutralizantes del HGF y del c-Met (Cao *et al*, 2001; Jin *et al*, 2008; Villaflor *et al*, 2013).
- e. Inhibidores de la secreción de HGF como el ATRA (Chattopadhyayn *et al*, 2001).
- f. Inhibidores de COX-2 (Sengupta S *et al*, 2003).
- g. Inhibidores del interferón alfa (IFN- α), que disminuye la transcripción de c-Met (Radaeva S *et al*, 2002).

II.3.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El VEGF fue descubierto en 1983 por Senger *et al.* Este grupo describió la purificación parcial de una proteína que causaba permeabilidad vascular tras su inyección en la piel de cobayas. Debido a esta propiedad, el factor fue llamado factor de permeabilidad vascular (VPF) y se creyó que su principal función era regular de manera específica la permeabilidad de la red vascular tumoral.

Posteriormente, Ferrara y Ploüet (Ferrara *et al.*, 1989; Ploüet *et al.*, 1989), de manera independiente, describieron una sustancia mitógena específica para células endoteliales a la que llamaron, respectivamente, factor de crecimiento endotelial vascular y vasculotropina. El clonaje y la expresión del VEGF y el VPF revelaron que ambas eran, en realidad, la misma molécula (Keck *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989).

II.3.2.1. Estructura y Funciones biológicas

El VEGF es una glicoproteína homodimérica (Asn75) de 45 kDa, con varios puentes disulfuro intra e intercatenarios. Los dos monómeros se asocian de forma antiparalela, y su reducción implica la pérdida total de su actividad biológica. La localización cromosómica del gen del VEGF humano es 6p21.3 (Vincenti *et al.*, 1996). Este gen se halla compuesto por ocho exones y siete intrones, con una región codificante de una longitud aproximada de 14 kb. Las diferentes isoformas del VEGF podrían estar biodisponibles mediante difusión libre o tras la acción de proteasas sobre las isoformas más grandes (Ferrara *et al.*, 1999; Dvorak *et al.*, 2002).

El nivel de expresión del VEGF es diferente durante la fase de embriogénesis que en el adulto; así, mientras que es más amplia en el primer caso, detectándose en pulmón, glándula adrenal, testículo, riñón y cerebro (Breier *et al.*, 1992); en el adulto, en condiciones normales, la expresión de VEGF es baja o inexistente en la mayoría de tejidos y está limitada a órganos que presentan capilares con endotelio fenestrado, como son el plexo coroidal y los glomérulos renales (Breier *et al.*, 1992; Millauer *et al.*, 1993), o en situaciones de angiogénesis fisiológica, como la que tiene lugar cíclicamente en el tracto reproductor femenino (Ferrara *et al.*, 1998;

Geva *et al*, 2000). En cambio, la expresión de VEGF puede ser activada por diferentes factores en otra localización.

El VEGF es una glicoproteína multifuncional que ejerce la mayoría de sus funciones en el endotelio vascular. Entre estas funciones se encuentran ser el principal inductor de la angiogénesis, la vasodilatación, la migración de las células endoteliales vasculares, y la supervivencia de células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis. Ligado a estas funciones se ha descrito su implicación en los procesos de crecimiento esquelético, maduración del cuerpo lúteo y angiogénesis uterina y curación de heridas.

Además de estas acciones se han observado efectos en otros tipos de células (Ferrara *et al*, 2003), como son la quimiotaxis de los monocitos, la inhibición de la maduración de las células dendríticas, el aumento de la producción de células B y generación de células mieloides inmaduras.

II.3.2.2. Vías de señalización

La familia VEGF se compone de 5 miembros: el primero es el VEGF-A (con trece isoformas del VEGF-A, de las cuales siete son humanas -VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆-; Roskoski *et al*, 2007; Gabhann *et al*, 2008). Las que presentan mayor expresión son la VEGF₁₂₁ y la VEGF₁₆₅ que se unen con la totalidad de receptores de VEGF (Stefanini MO *et al*, 2009). El resto de los miembros son VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF (Factor Inductor del Crecimiento Placentario).

Por otra parte, existen varios tipos de receptores para VEGF:

a) VEGFR-1/Flt-1 (*fms like tyrosine kinase*). Tiene una alta afinidad por el VEGF circulante pero baja actividad fosforilasa de las tirosina kinasas y se localiza en la superficie de la membrana celular de las células endoteliales durante el desarrollo embrionario (McMahon *et al*, 2000).

b) VEGFR-2/Flk-1/KDR (*fetal liver kinase-1/kinase domain containing receptor*). Presenta una baja afinidad por el VEGF circulante y es el principal mediador en la migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales, así como de la permeabilidad celular (Roskoski *et al*, 2007).

c) VEGFR-3/Flt-4. Existe controversia sobre su afinidad sobre VEGF-A; así algunos autores defienden su activación por dicho factor (Alam *et al*, 2004), mientras que otros no consideran tal efecto (Dixelius *et al*, 2003). Sin embargo, el VEGF-C induce la activación del receptor.

Existen a su vez co-receptores para el VEGF, la familia de neuropilinas NRP-1 y NRP-2, que se expresan en numerosos subtipos celulares, pero carecen de la capacidad de transmitir la señal intracelular una vez se han unido a las isoformas de VEGF. En este sentido las posibilidades de combinación de VEGF y NRP son VEGF₁₆₅ – NRP-1, que sirve de puente para el complejo VEGFR-2-NRP-1 (Stefanini, *et al*, 2009); o bien VEGF₁₂₁ – NRP-2, que es inactivo.

Por último, el VEGF₁₆₅ contiene un dominio de unión a heparina que es capaz de unirse a las cadenas heparán sulfato glucosaminoglucano (GAG) de la matriz extracelular (MEC) y las membranas celulares (Ferrara *et al*, 1989).

Si bien la vía de señalización celular del VEGFR-1 no tiene efectos proliferativos directos, incrementa la expresión de moléculas que juegan un papel esencial en la degradación de la MEC, en la migración celular y la quimiotaxis de los monocitos (Barleon *et al*, 1996; Olofsson *et al*, 1998). La vía de señalización celular de VEGFR-2 conduce a la activación de fosfolipasa C gamma (PLC- γ) que, a su vez, activa la PKC (Roy *et al*, 2008). Se da inicio así a la vía Raf-MAPK que determina la angiogénesis (Holmqvist *et al*, 2004; Olsson *et al*, 2006).

II.3.2.3. Implicación en el desarrollo tumoral

Recientemente se ha asociado la presencia de VEGF circulante en sangre como un posible factor pronóstico en RMS infantil, dado que en dichos pacientes, los

niveles sanguíneos de VEGF estaban significativamente incrementados (Schiavetti A *et al*, 2012).

El VEGF y sus receptores están implicados en la angiogénesis que sucede en los tumores sólidos incluyendo el cáncer de mama (Kurebayashi *et al*, 1999), de colon (Shaheen *et al*, 1999), hepatoma (Yoshiji *et al*, 1999), cáncer de vejiga (Droller *et al*, 1998), gástrico (Kitamura *et al*, 1998) y de próstata (Balbay *et al*, 1999), entre otros.

Se conoce su implicación en la transformación oncogénica de las células, que pasa por ser un proceso asociado frecuentemente a la sobreexpresión de VEGF (McMahon *et al*, 2000; Kubota *et al*, 2012). Además, se ha asociado la angiogénesis a la progresión desde una lesión inicial premaligna a un cáncer invasivo (Folkman *et al*, 2003). Numerosos estudios han demostrado el papel crucial del VEGF en la neovascularización asociada al tumor, lo cual permite a las células tumorales proliferar y metastatizar. Es por esto que la angiogénesis es una de las principales dianas terapéuticas en la actualidad (Tortora *et al*, 2004).

La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF (Marti *et al*, 1998; Ferrara *et al*, 1999) tanto en células sanas como en tumorales (McMahon *et al*, 2000). La disminución de la tensión de oxígeno causa un aumento de la transcripción del gen de VEGF a través del factor de transcripción HIF1 (*Hypoxia inducible factor 1*).

El evento inicial de la transcripción y secreción del factor inducido por la hipoxia por parte del tumor comienza con la regulación y activación de los receptores del factor. Esto provoca la extensión endotelial, el incremento de la permeabilidad vascular, la expresión de metaloproteinasas de la MEC (MMPs) y la digestión de la MEC, que es necesaria para la migración de las células. El aumento de la mitogénesis endotelial y la activación de otros factores llevan a la formación y migración de las células endoteliales, incluyendo otras células de soporte como los

pericitos, y que deriva en la extensión vascular, incremento en la integridad capilar, la diferenciación de las células de soporte de la microvasculatura y la formación de la red vascular (Benjamin *et al*, 1997; Kubota *et al*, 2012).

Por otro lado, estudios sobre líneas celulares tumorales han demostrado la inducción de VEGF a través de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y la interleukina 1 (IL-1; Ferrara *et al*, 1997; Neufeld *et al*, 1999; Kubota *et al*, 2012). La regulación de este proceso es tanto autocrina, como paracrina.

II.3.2.4. Estrategias terapéuticas

Las aproximaciones potenciales para bloquear la actividad del VEGF incluyen la inhibición de la secreción de VEGF endógena por parte del tumor, la neutralización del VEGF circulante en sangre y la inhibición de la unión del VEGF a sus receptores, impidiendo la cascada enzimática subsecuente.

Entre los agentes utilizados se pueden citar los siguientes:

- Anticuerpos monoclonales, como el bevacizumab (Aragon-Ching *et al*, 2009).
- Inhibidores de tirosina kinasas, como el sorafenib (BAY 43-9006; Sleijfer *et al*, 2008), el sunitinib (SU11248; Sleijfer *et al*, 2008), el pazopanib (Sleijfer *et al*, 2008), el vandetanib (ZD6474; Kiura *et al*, 2008), el semaxinib (SU5416; Fong *et al*, 1999; Morabito *et al*, 2006), el sutent (SU11248; Chow *et al*, 2007), o el cediranib (AZD2171; Takeda *et al*, 2007; Wedge *et al*, 2005).
- VEGFR soluble, una molécula recombinante de Flt-1 soluble puede unirse al VEGF circulante y reducir la cantidad disponible para la unión a los receptores de membrana celular.
- Pequeñas moléculas inhibidoras de la señalización de VEGF, como el ZD4190 (Hennequin *et al*, 1999; Wedge *et al*, 1999), el CGP41251 (Fabbro *et*

al, 1999) o la talidomida y sus análogos como lenalidomide (CC-5013/Revlimid; Sleijfer *et al*, 2008).

II.3.3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue descubierto por Cohen en 1962 (Cohen *et al*, 1962) y estimula la proliferación y queratinización de tejidos epidérmicos *in vivo* e *in vitro* (Cohen *et al*, 1983). La proteína humana homóloga, se aisló de la orina y es estructural y funcionalmente idéntica a la urogastrona. El EGF es un factor mitogénico que estimula la proliferación de varios tipos celulares incluyendo células epiteliales y fibroblastos (Gregory *et al*, 1975; Yamada *et al*, 1997). En la actualidad, se ha descrito su implicación en el crecimiento y proliferación de células tumorales, la migración celular, la metástasis y la angiogénesis.

II.3.3.1. Estructura y funciones del EGF

El EGF es un polipéptido constituido por 53 aminoácidos de los que seis son residuos de cisteína (Savage *et al*, 1973; Carpenter *et al*, 1979; Yamada *et al*, 1997). Éstas forman tres puentes disulfuro intramoleculares (Savage *et al*, 1973) de gran importancia en la función fisiológica del EGF (Taylor *et al*, 1972). El EGF es sintetizado como un precursor inmaduro que madura mediante proteólisis (Yamada *et al*, 1997).

Este precursor compete con las formas maduras del mismo por la unión al receptor de EGF (EGFR) y estimula la proliferación en la misma manera que las formas maduras de EGF. Se ha demostrado que el precursor de EGF tiene un papel crucial en la interacción célula-célula *in vivo* (Chan *et al*, 2000; Wong *et al*, 2003).

Estructuralmente, existen varios factores de crecimiento similares al EGF y que debido a ello, conforman la familia EGF. Esta familia consta de tres grupos de factores:

Grupo 1: moléculas como el TGF α , la anfirregulina, el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF), la betacelulina y el factor de diferenciación neu, también denominado heregulin (NDF/HRG). TGF α , anfirregulin y EGF únicamente se unen y activan receptores de EGF (también denominados ErbB-1 y HER-1).

Grupo 2: consiste en las neurregulinas, que se unen a ErbB-3 y ErbB-4.

Grupo 3: consiste en el HB-EGF, la betacelulina y la epirregulina, que son capaces de unirse tanto a los receptores de EGF, como a ErbB-4.

El EGF destaca por las siguientes funciones:

- Agente mitógeno para células de origen mesodérmico o ectodérmico (Carpenter *et al*, 1987; Yamada *et al*, 1997).
- Potente estimulador de la proliferación de fibroblastos y queratinocitos murinos.
- Regulador de las interacciones célula-célula.
- Controla la migración celular, el crecimiento celular y los cambios morfológicos.
- Se halla implicado en la neurogénesis.
- Regulador del crecimiento y supervivencia de las células tumorales, en los fenómenos de migración celular, metástasis y angiogénesis.

II.3.3.2. Vía de señalización del EGF

La familia del EGFR, también conocida como receptores ErbB (ErbBs), consiste en 4 receptores transmembrana con actividad TK e incluye el EGFR (ErbB1/HER1), ErbB2/neu/HER2, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 (Schlessinger *et al*, 2002). Todos ellos tienen una estructura común, con un dominio extracelular de unión al ligando, una región de membrana, un dominio TK citoplasmático y una terminación C-terminal con múltiples lugares de fosforilación. La activación de los ErbBs está controlada por sus ligandos, miembros relacionados con la familia del péptido EGF (Peles *et al*, 1993; Riese *et al*, 1998; Seshacharyulu *et al*, 2012).

La unión a ErbBs induce la formación de homo y heterodímeros, que promueven la activación de dominios quinasa intrínsecos y la consiguiente fosforilación de residuos tirosina específicos en la cola citoplasmática del receptor.

Estos residuos fosforilados sirven como lugares de anclaje de varias moléculas señalizadoras, cuyo reclutamiento implica la activación de vías de señalización intracelulares, como la MAP-quinasa (con destino mitogénico), la JAK/STAT que han demostrado estar implicadas en la transformación celular tumoral y en mecanismos de resistencia a la quimioterapia (Vigneron *et al*, 2008) y las del fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que controlan la proliferación, la migración y la apoptosis (Figura 17; Yarden *et al*, 2001; Schlessinger *et al*, 2002; Hynes *et al*, 2005).

En general, la liberación proteolítica de los ligandos del EGFR representa un paso regulador importante en la activación del receptor (Shi *et al*, 2003; Jackson *et al*, 2003) y, de hecho, el bloqueo de la liberación de los ligandos para los ErbBs inhibe la proliferación y migración celulares en aquellas líneas celulares dependientes de EGFR (Dong *et al*, 1999).

Sin embargo, muchos ligandos precursores de EGFR, incluyendo el HB-EGF y el TGF- α , son biológicamente activos incluso cuando dichos ligandos se encuentran anclados a la membrana plasmática, lo cual sugiere que puedan actuar como factores yuxtacrinos (Tada *et al*, 1999; Iwamoto *et al*, 2000; Singh *et al*, 2007).

II.3.3.3. Implicación en el desarrollo tumoral

Los receptores de EGF se encuentran sobre-expresados habitualmente en las células tumorales (Normanno *et al*, 2006). Por ejemplo, EGFR y ErbB3 se hallan sobre expresados en el 50–70% de los tumores de pulmón, colon, y mama; ErbB2 en el 30% de los de mama; ErbB4 en el 50% de los de mama y en el 22% de los tumores de colon (Lu *et al*, 2010; Hardy *et al*, 2010).

Las mutaciones de los genes de ErbB han sido ampliamente investigadas y se han descrito para los cuatro miembros de la familia (Normanno *et al*, 2006; Wieduwilt y Moasser, 2008). Ejemplos de estas mutaciones son la amplificación génica y la delección de los dominios extracelulares presentes en el 40-60% de los gliomas multiformes y la mutación de dominios quinasa de EGFR en pacientes de tumores de pulmón.

La amplificación génica de ErbB2 se halla presente en el 20–30% de los tumores de mama. La amplificación génica deriva en sobreexpresión, mientras la delección de los dominios extracelulares y las mutaciones en los dominios quinasa a menudo rinden receptores constitutivamente activos, lo cual se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad (Ravdin *et al*, 1995). Aún más, la coexpresión de dos o más miembros de la familia ErbB se asocia con una peor respuesta a la terapia (Normanno *et al*, 2006).

Además de estimular la proliferación tumoral, la vía de señalización del EGF se ha visto implicada en la angiogénesis asociada al tumor y la metástasis medular (De Luca *et al*, 2008). Estimula la expresión de VEGF en una variedad de células tumorales EGFR positivas como el glioblastoma, cáncer gástrico, carcinoma escamoso vulvar, vejiga y próstata (De Luca *et al*, 2008; Lu *et al*, 2010).

II.3.3.4. Estrategias terapéuticas

Los receptores de EGFR se encuentran sobreexpresados en diversos tipos celulares y este hecho se asocia a un pronóstico desfavorable en múltiples tumores humanos (Hudson *et al*, 2009). Es por esta razón que las estrategias terapéuticas han encaminado sus esfuerzos a regular el EGFR o su vía de señalización. De hecho, la utilización de diversos antagonistas selectivos de la familia EGFR y Her-2 ha demostrado beneficios clínicos. Entre estos antagonistas cabe destacar:

- a) Anticuerpos monoclonales, como el cetuximab (Wong *et al*, 2005), el panitumumab (ABX-EGF; Giusti *et al*, 2008) o el matuzumab (EMD72000; Xiong *et al*, 2007).
- b) Inhibidores de la actividad TK, como el erlotinib (Ouchi *et al*, 2006; Meyerhardt *et al*, 2007), el gefitinib (ZD1839; Magne *et al*, 2003; Chau *et al*, 2007), el canertinib (Seshacharyulu *et al*, 2012) o el lapatinib (GW572016; Barr *et al*, 2008).
- c) Nuevos compuestos como la capsaicina, la curcumina o la combinación erlotinib-genisteína (Seshacharyulu *et al*, 2012).

II.3.4. Factor de crecimiento similar a la insulina-2 (IGF-2)

El efecto estimulador de la hormona de crecimiento (GH) sobre el crecimiento del cartílago *in vivo*, desaparecía cuando dicho efecto pretendía ser reproducido, administrando GH a cultivos *in vitro*. Sin embargo, se demostró que en el plasma normal existía una sustancia capaz de estimular el crecimiento del cartílago en cultivo. Esta sustancia se denominó somatomedina, ya que era capaz de intervenir en muchas más actividades metabólicas, indicando así, que la sustancia actuaba como mediador en el crecimiento somático (Daughaday *et al*, 1972).

Cuando se secuenció e identificó la estructura molecular de dicho factor, se propuso cambiar su nomenclatura y denominarla IGF 1 y 2 (*Insulin Like Growth Factor*), para resaltar tanto las similitudes estructurales con la insulina como su importante papel en el crecimiento.

II.3.4.1. Estructura y función

El sistema IGF se compone de tres ligandos IGF: IGF-1, IGF-2 e insulina. Todos son polipéptidos monocatenarios que comparten una estructura secundaria similar compuesta por 3 alfa-hélices y 3 puentes bisulfuro (Laviola *et al*, 2008).

Cada ligando desarrolla una vía de señalización única no siendo capaz de compensar al otro. De los tres, IGF-1 e IGF-2 conforman la base de la vía de señalización de la familia del factor.

El IGF-2 humano se caracteriza por ser una proteína de 7,5 kDa, que contiene homologías estructurales y secuenciales con el IGF-1 (Baxter *et al*, 1986). El IGF-2 maduro consiste en dos dominios A y B homólogos a los dominios A y B de la insulina. La expresión de IGF-2 en humanos se realiza durante toda la vida (pre y postnatal) en múltiples tejidos. De hecho, los valores circulantes de IGF-2 en humanos son muy superiores que los de IGF-1, lo que explica que ambos tengan roles divergentes en la fisiología humana (Daughaday *et al*, 1989).

La mayoría del IGF-2 circulante se encuentra unido a un complejo de gran peso molecular (150kDa) formado por la proteína de unión específica al factor de crecimiento similar a la insulina 3 (IGFBP-3) y la subunidad lábil ácida (Firth *et al*, 2002). Cuando se disocia este complejo ternario, el compuesto binario resultante (IGFBP-IGF-2) se retira de la circulación y atraviesa el endotelio para llegar a los tejidos diana e interactuar con los receptores de membrana celulares.

Estos complejos tienen una mayor afinidad por los ligandos de IGF que los receptores de IGF conocidos, y potencian la actividad de IGF al incrementar su vida media en el torrente circulatorio, o al unirlas a ciertas moléculas de la superficie celular, proporcionando así un reservorio disponible de IGF en el microentorno local de la célula (Yakar *et al*, 2002; Bach *et al*, 2005). Los receptores de membrana que median los efectos biológicos de los IGFs, son tres: el IGF-1R, el IGF-2R y el receptor de insulina IR.

El IGF-2 es un factor de crecimiento que se halla bajo el control de hormonas y factores de crecimiento tisulares. La hormona de crecimiento (GH) es el factor primario desencadenante de la síntesis y expresión de la IGF-2, producida principalmente en el hígado.

Sin embargo, gran cantidad de factores fisiológicos, como la privación de nutrientes, pueden también desencadenar la producción de IGF-2 independiente de GH (Reik *et al*, 2001; Pavelic *et al*, 2002). La principal función endocrina del sistema IGF consiste en mediar los efectos inductores de la proliferación ejercidos por la GH. Sin embargo, dicho sistema IGF también participa de modo paracrino/autocrino en procesos que son esenciales para la regulación de la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular (Laviola *et al*, 2008).

El IGF-2 tiene una reconocida actividad mitogénica, estando implicado directamente en el crecimiento y desarrollo normal del organismo; así, cumple una función fundamental en el desarrollo del tejido muscular, donde regula la diferenciación a miocito inducida por Myo-D, y es esencial en el desarrollo óseo, donde promueve la proliferación y diferenciación de las células óseas.

Además, se ha asociado el desequilibrio alélico (tan frecuente en diferentes variedades de tumores) de IGF-2 con el desarrollo de tumores como el colorrectal (Docquier *et al*, 2005) y se ha establecido su papel en la angiogénesis al inducir la vía de señalización del VEGF mediante la inducción de HIF (Kim *et al*, 2008).

II.3.4.2. Vía de señalización

Existen receptores cuya combinación entre sí da lugar a los diferentes tipos de combinaciones de receptores (Kim *et al*, 2008):

- a) Receptores IGF tipo I y tipo II (IGFR-I e IGFR-II)
- b) Receptores de la insulina A y B (IR-A e IR-B)
- c) Receptores híbridos (IGFR-I/IR-A y IGFR-I/IR-B)

Tanto el IGF-1 como el IGF-2 interactúan con una variedad de receptores de membrana que se hallan presentes sólo o combinados en las células diana. Ambos interactúan con el IGFR-I, una tirosina quinasa transmembrana que está estructural y funcionalmente relacionada con el receptor de insulina (IR). El IGF-2 puede, a su vez, unirse al IGFR-II con gran afinidad. La complejidad de la señalización de IGF se

incrementa con la formación de receptores híbridos que resultan de la dimerización de los hemirreceptores IGFR-I e IR. Cada receptor híbrido consiste en una subunidad α y β unidas por puentes bisulfuro.

Esto puede deberse a la formación preferente de puentes bisulfuro entre residuos cisteína en los propios hemirreceptores. De este modo, los receptores híbridos superan en número, en ocasiones, a los homorreceptores en la membrana plasmática.

Los receptores híbridos IGFR-I/IR mantienen una elevada afinidad por IGF-1, pero reducen drásticamente su afinidad por la insulina. Esto es debido a que, para que se produzca la unión de la insulina, las dos subunidades β del receptor IR han de estar presentes, mientras que para la unión de IGF-1 sólo es necesaria una de las dos subunidades α . De este modo, la presencia de un elevado número de receptores híbridos en la membrana de una célula reduce dramáticamente su respuesta a la insulina, no así al IGF-1 o IGF-2 (Pandini *et al*, 2002).

La unión de IGF-2 a IGFR-I provoca la fosforilación de 3 residuos tirosina quinasa. Además, la fosforilación de residuos tirosina quinasa adicionales en otras áreas de la subunidad β proporcionan centros catalíticos que permiten el reclutamiento de proteínas adaptadoras. Los miembros de la familia de sustratos del IR son algunas de las múltiples proteínas adaptadoras que tienen su importancia en la señalización del IGFR-I. Esta fosforilación de proteínas adaptadoras conlleva la unión de más proteína IGF-2, lo que permite diversificar la señalización celular en varias rutas específicas. Algunas de las rutas incluyen: la fosforilación de la MAPK con el consiguiente incremento de la proliferación; la activación de PI3K, que provoca la reducción de la apoptosis; y la modulación de la rapamicina (mTOR), lo que induce la adaptación translacional en dichas subunidades β .

II.3.4.3. Implicación en el desarrollo tumoral

Existen numerosas evidencias de la implicación de la señalización de IGF en tumores pediátricos, entre ellos, el RMS (Toretsky *et al*, 2009). En las células normales, la actividad del receptor tirosina quinasa está estrictamente regulada, lo que permite un crecimiento homeostático. En las células tumorales, estas mismas moléculas se encuentran activadas, bien por mutación, translocación cromosómica, estimulación anormal (autocrina, endocrina o paracrina) o pérdida de impronta genómica. Se han demostrado alteraciones epigenéticas que derivan en pérdida de la herencia mendeliana hacia herencia directa (*Loss Of Imprinting*) del locus de IGF-2 de uno de los progenitores, y que causan la sobreexpresión de dicho gen (Zhan *et al*, 1994).

A esto hay que añadir que la translocación PAX3-FKHR que caracteriza el ARMS transactiva el promotor del IGFR-I, lo cual evidencia la importancia de la vía de señalización de IGF en la progresión del RMS (Ayalon *et al*, 2001) ya que todas las líneas celulares de RMS muestran algún nivel de expresión de IGFR-I (Cao *et al*, 2008). Específicamente, se ha observado en pacientes afectados de ARMS y ERMS, altos niveles de IGF-2 (Minniti *et al*, 1994), como consecuencia del descubrimiento de la secreción por parte de las líneas celulares de RMS de IGF-2. Éste se une a IGFR-I lo que provoca la inducción autocrina de la proliferación y un aumento en la motilidad celular (El-Badry *et al*, 1990).

Se ha demostrado la implicación de IGF-2 en múltiples procesos tumorales, entre los que cabe destacar:

- a. Tumorigénesis: ciertos tumores muestran dependencia de los factores de crecimiento durante sus etapas más tempranas de tumorigénesis, para, en etapas posteriores, librarse de esta dependencia y continuar con su proliferación descontrolada (Capoluongo *et al*, 2011; Gallager *et al*, 2011; Bartela *et al*, 2012).
- b. Proliferación, supervivencia y apoptosis (Cheng *et al*, 2011).

- c. Factores pronósticos tumorales: altos niveles circulantes de IGF-1 constituyen un factor de riesgo del desarrollo de cáncer de mama, próstata, colon y pulmón (Schairer *et al*, 2010). Los niveles de expresión de IGFR-I e IR son valores pronósticos de cáncer de mama (Demarco *et al*, 2012).
- d. Motilidad celular: facilita la pérdida de unión de la célula a su membrana basal, facilitando su migración hacia un entorno en el que seguir proliferando (Puxbaum *et al*, 2012).
- e. Interactuar con otras vías de señalización celulares para inducir otros procesos tales como la vascularización (mediante la inducción de producción de VEGF mediada por hipoxia), así como de la remodelación de la MEC y la invasividad tumoral a través de interacciones con las MMTs o el sistema de activación de la plasminógeno urokinasa (Fukuda *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003; Bauer *et al*, 2005).

II.3.4.4. Estrategias terapéuticas

Entre las diferentes estrategias terapéuticas propuestas, caben destacar las siguientes:

- a. Disminución de la concentración de IGF-2 en sangre. Utilizándose moléculas análogas a la somatostatina, como el actreotido palmoato, para inhibir la secreción de GH, (OncoLar; Mansky *et al*, 2002); o moléculas antagonistas, como el pegvisomant que se une a GHR pero no activa la señalización del receptor (Yin *et al*, 2007). También se valoran otras posibilidades como el hecho de que la reducción del IGF-2 circulante en sangre sea efectiva en experimentación animal, pero no lo sea en ensayos clínicos, donde los pacientes expresan mayores niveles sanguíneos de IGF-2 (Chao *et al*, 2008).
- b. Inhibición de la transcripción de genes implicados en la expresión de IGF-2. Se han utilizado con éxito los métodos de interferencia de ADN/RNA que reducen la transcripción de genes implicados en la expresión de IGF-2 (Resnicoff *et al*, 1994), o RNA antisentido que inhibe la expresión de IGFR-I (Rinisland *et al*, 1997). Aun así, se han de desarrollar agentes efectivos en

humanos que reduzcan su susceptibilidad a la degradación, que incrementen su reposición por parte de las células y que tengan asimilación preferencial por parte de las células tumorales (Kim *et al*, 2009).

c. Utilización de pequeñas moléculas inhibidoras de las kinasas. Estas moléculas interfieren con la capacidad del dominio TK de fosforilar las moléculas diana, impidiendo la propagación de la señalización intracelular inducida por el factor. Resultados esperanzadores se están obteniendo con NVP-AEW541, AG538 y picropodofilin cicloglicano en cáncer colorrectal (Donovan *et al*, 2008; Tabla 11).

Tabla 11. Agentes con diana en la vía de señalización de IGF (Donovan EA *et al*, 2008).

Grupo	Agente	Fase de ensayo clínico
Anticuerpos frente a IGF-1R	A12 (IMC-A12)	I
	CP-751,871	I, II
	AMG 479	I
	R1507	I
	EM164 (AVE1642)	Preclínico
	hC710 (A2CHM)	Preclínico
	19D12	Preclínico
	scFv-Fc-IGF-1R	Preclínico
	Di- diabody	Preclínico
Inhibidores de kinasas de IGF-1R	INSM-18	I
	NVP-ADW742	Preclínico
	NVP-AEW541	Preclínico
	Picropodofilín cicloglicano	Preclínico
	AG538	Preclínico
	BMS-554417	Preclínico
	BMS-536924	Preclínico
	OSI-906	Preclínico
Otros agentes	IGF-1R/AS ODN	I
	486/Stop	Preclínico
	IGFBP-3	I
	IGFBP-1	Preclínico

II.3.5. Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF_b)

Los FGFs representan una de las mayores familias de factores de crecimiento y diferenciación sobre células de origen mesodérmico (Baird *et al*, 1991). Una característica común de los miembros de la familia FGF es su unión a los heparán o a los heparánulfatos que les protege frente a la degradación.

La familia FGF consiste en un grupo de factores de crecimiento polipeptídicos estructuralmente relacionados. Hasta la fecha, se han descubierto 25 FGF diferentes. El primer factor de crecimiento fibroblástico fue descubierto como mitógeno de fibroblastos en cultivo (Gospodarowicz *et al*, 1974). Aunque los FGFs varían en tamaño de 17 a 34 kDa, todos los miembros de la familia conservan una secuencia aminoacídica de 120 aminoácidos que contiene un 15-65% de homología (Ornitz *et al*, 2001).

II.3.5.1. Estructura y función

Uno de los FGF mejor caracterizados es el FGF-2 o FGF_b, que puede considerarse el factor prototipo de la familia FGF (Baird A *et al*, 1991; Figura 23). El FGF_b tiene una gran afinidad por los glicosaminglicanos (GAG) y la heparina, que son importantes componentes de la MEC (Ornitz *et al*, 2000). La asociación de los FGFs y los GAG o heparinas de la MEC, crean un reservorio local de FGFs en la superficie de la membrana celular, protegiendo a dichos factores de la desnaturalización o degradación proteolítica (Tassi *et al*, 2001). El FGF_b existe en una gran variedad de isoformas, desde los 18 hasta los 24kDa, que derivan de una única especie de ARNm. La isoforma de 18kDa es primariamente citosólica, pero también se secreta y puede formar reservorios de FGF_b en la MEC. Por el contrario, las formas mayores son predominantemente nucleares.

Durante el desarrollo embrionario intervienen en la morfogénesis al regular la proliferación, la diferenciación y la migración celular para diferentes tipos celulares, incluyendo el epitelial y mesenquimal. En esta fase, la perfecta coordinación y regulación de varias vías de señalización celulares es vital para

garantizar la correcta morfogénesis. En el organismo adulto, los FGFs están implicados en el proceso inflamatorio, la cicatrización, la hematopoyesis, la angiogénesis (Ichimura *et al*, 1995), actúan en el control del sistema nervioso y en la reparación tisular (Givol *et al*, 2003).

II.3.5.2. Vía de señalización

Varios estudios han demostrado la existencia de una intrincada red de señalización entre los diferentes FGFs, sus receptores (FGFRs), las proteínas de unión a los FGFs (FGFBPs) y los GAG que modulan la señalización de FGF (Tassi *et al*, 2001). Los FGFs median su acción celular mediante TK transmembrana, que ejercen su señalización a través de cuatro diferentes receptores TK designados como FGFR 1-4 y que comparten entre el 55 y el 72% de homología a nivel proteico (Powers *et al*, 2000). Los FGFRs constan de un dominio extracelular de unión al ligando compuesto por 3 dominios inmunoglobulina (IgI, IgII e IgIII), un dominio transmembrana y un dominio TK intracelular.

Aunque han sido identificados más de 20 FGFs con diversos efectos en distintas células diana, sólo han sido descubiertos cuatro FGFRs (Powers *et al*, 2000). La expresión de diferentes variantes aminoacídicas es la que permite que sólo cuatro genes FGFR codifiquen tal variedad de FGFRs capaces de unirse a tantos ligandos para desarrollar el tipo de diversidad de señalización intracelular específica de cada uno de ellos.

Cambios estructurales en el dominio IgIII dan lugar a diferentes isoformas del FGFR que, además, alteran la afinidad de unión específica para las diferentes variedades de FGF.

Tras la secreción y/o liberación por las células, los FGFs se localizan débilmente unidos a los proteoglicanos o los heparansulfatos de la MEC. Estas interacciones aumentan su vida media, pero reducen sus actividades biológicas. Se han descrito dos posibles mecanismos para describir cómo los FGFs se liberan de sus

reservorios en la MEC. Enzimas, como la heparanasa, que se expresan en varios tumores, pueden degradar las cadenas heparan sulfato y el esqueleto proteoglicano de la MEC, liberando así los FGFs (Elkin *et al*, 2001). Un mecanismo alternativo implica a las FGFBPs, secretadas como proteínas de aproximadamente 17kDa, que se unen reversiblemente a los FGFs evitando su degradación y conservando su actividad biológica (Wu *et al*, 1991). La expresión de las FGFBPs está incrementada en varios tipos tumorales como el cáncer renal, carcinoma adrenal o de próstata. Esta correlación sugiere la posibilidad de actuar sobre las FGFBPs como posible medio para regular la expresión de los FGFs.

Tras la unión a sus FGFRs, los FGFs inducen la dimerización del FGFR. A continuación, se inician varias vías de transducción de la señal entre las que destacan la elevación de los niveles de calcio intracelulares, la inducción de la protein quinasa activada por la señal mitogénica y la PKC, la estimulación de la adenilato ciclasa y la inducción de los protooncogenes *myc* y *fos*. Estas señales intracelulares provocan varias respuestas intracelulares biológicas durante la ontogénesis, el crecimiento celular y los procesos de reparación, así como durante la tumorigénesis (Cronauer *et al*, 2008).

II.3.5.3. Implicación en el desarrollo tumoral

En el caso del RMS, los cuatro receptores se encuentran implicados en el desarrollo de este tipo tumoral, siendo aquellos que expresan el FGFR3, los más tumorigénicos (Wesche J *et al*, 2011).

La expresión de FGFs se encuentra incrementada de manera sustancial en diferentes tumores como el de próstata, vejiga, renal y testicular (Suzuki *et al*, 2001; Brooks *et al*, 2012). La expresión alterada de FGF puede tener una gran variedad de efectos, incluyendo la estimulación de la proliferación o la inhibición de la muerte celular.

Los FGFs pueden promover el crecimiento tumoral mediante diferentes mecanismos: como inductores angiogénicos, como mitogénicos para las propias células tumorales y como inhibidores de la apoptosis (Cronauer *et al*, 2003; Brooks *et al*, 2012). Además, muestran también un incremento en la invasividad de una gran variedad de tipos celulares tumorales como el de próstata, vejiga, riñón, mama, y páncreas (Cronauer *et al*, 1997; Brooks *et al*, 2012).

II.3.5.4. Estrategias terapéuticas

Cada vez existen más evidencias de la importancia de la vía de señalización del FGFR en la supervivencia de los tumores, convirtiendo cada paso de la misma en una posible diana terapéutica. Hasta ahora, las aproximaciones clínicas se dirigen a las propiedades angiogénicas del FGF_b. Se ha demostrado la capacidad de los metabolitos de talidomida como inhibidores de la inducción angiogénica del FGF_b (Mei *et al*, 2008) en pacientes afectados de cáncer colorrectal (Daruwalla *et al*, 2005).

Entre los diferentes agentes antitumorales utilizados se pueden citar el suramin (Walther *et al*, 1996; Song *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2001), el interferón α o β (Dinney *et al*, 1995) o la terapia génica mediante ADN antisentido del FGF_b, (Kwabi-Addo *et al*, 2004; Cronauer *et al*, 2008). Sin embargo, un mayor conocimiento de la familia FGF permitirá aumentar el número de terapias que resulten más eficaces (Tabla 12).

Tabla 12. Nuevos agentes antitumorales cuya diana es FGF (adaptado de Brooks et al, 2012)

Agente	Diana	Desarrollo clínico
Brivanib	FGFR, VEGFR	Fase III
Dovitinib	FGFR, PDGFR, VEGFR, FLT3, c-KIT	Fase III
Lenvatinib	FGFR, PDGFR, VEGFR	Fase III
Masitinib	FGFR3, PDGFR, c-KIT	Fase III
Nintedanib	FGFR, PDGFR, VEGFR	Fase III
Pazopanib	FGFR1, FGFR3, VEGFR, PDGFR, c-KIT	Fase III
PI-88	FGF1, FGF2, VEGF	Fase III
Regorafenib	FGFR, PDGFR, VEGFR, c-KIT, RET	Fase III
TSU 68	FGFR, KDR, PDGFR, VEGFR2	Fase III
ENMD-2076	FGFR1, KDR, FGFR2, PDGFR, VEGFR, FLT3, c-KIT, Aurora K, FLT3	Fase II
Ponatinib	FGFR, PDGFR, VEGFR	Fase II
E3810	FGFR1, VEGFR	Fase I
PBI-05204	FGF2, AKT, NF-kB, p70S6K	Fase I
AZD4547	FGFR1–3	Fase II
BGJ398	FGFR1–3	Fase I
LY2874455	FGFR1–4	Fase I
RG7444	FGFR1–3	Fase I
FP-1039	FGF1, FGF2, FGF4	Fase II

II.3.6. Factor de crecimiento plaquetario-BB (PDGF-BB)

El PDGF se purificó a finales de los años 70 y fue descrito como un factor plaquetario capaz de inducir la proliferación de las células mesenquimales (Antoniades H.N. *et al* 1979; Raines E.W. *et al* 1982).

II.3.6.1. Estructura y funciones

El PDGF es una glicoproteína catiónica con un peso molecular de aproximadamente 30kDa compuesta por dos subunidades unidas covalentemente y designadas como cadena A (16kDa) y B (14kDa).

Se han descrito cuatro diferentes cadenas polipeptídicas (PDGF-A, -B, -C y -D) codificadas por cuatro diferentes genes (localizados en los cromosomas 4, 7, 11 y 22; Li *et al*, 2000; Fredrikson *et al*, 2004).

El PDGF destaca por las siguientes funciones:

- Agente mitógeno para células de origen mesenquimal como fibroblastos, células de la musculatura vascular, células de la glía y condrocitos (Montaseri *et al*, 2011).
- Potente quimioatractor y activador de neutrófilos, monocitos y fibroblastos (Rajkumar *et al*, 2006).
- Aumenta la síntesis de fosfolípidos, de ésteres de colesterol, glucógeno y prostaglandinas (Bessa *et al*, 2012).
- Modula la unión al receptor de LDL (Boucher *et al*, 2004).
- Controla la síntesis y degradación de la MEC (Yoshida *et al*, 2012).
- Estimula la síntesis de FCs adicionales (Blandford *et al*, 2006).
- Incrementa la eritropoyesis (Kamiski *et al*, 2001).
- Estimula la vasoconstricción.
- Es muy importante durante el desarrollo embrionario de testículos, riñón, pulmones, piel e intestino (Rajkumar *et al*, 2006).
- Se localiza en los gránulos α de las plaquetas y es liberado en la formación del coágulo. En este caso, el 70% del PDGF se halla en forma de dímero AB y el restante 30% en forma de dímero BB (Kaminski *et al*, 2001).
- Es importante en la cicatrización de heridas, arterosclerosis, fibrosis orgánica y tumorigénesis (Fredrikson *et al*, 2004; Reigstad *et al*, 2005).
- Existen otras células, como los fibroblastos, los queratinocitos, las células endoteliales y las células epiteliales, que también expresan el PDGF (Hoch *et al*, 2003).

II.3.6.2. Vía de señalización

Las cinco formas isoméricas del PDGF (AA, BB, AB, CC y DD) muestran distinta afinidad para unirse y activar los dos receptores de PDGF. Los receptores de

PDGF constan de dos subunidades, la subunidad α y la subunidad β . Ambas se dimerizan homo o heterológamente y forman receptores para los ligandos PDGF: PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ y PDGFR- $\beta\beta$ ((Li *et al*, 2000; LaRochelle *et al*, 2001; Tallquist *et al*, 2004). El PDGF-A se une solamente a la cadena α ; en cambio, el PDGF-B se une a todos los tipos de dimerización de los receptores. Tras el procesamiento proteolítico, el núcleo del dominio de PDGF-CC parece presentarse principalmente como ligando del PDGFR- α , independientemente de que aparezca el PDGFR como homodímero PDGFR- $\alpha\alpha$ o heterodímero PDGFR- $\alpha\beta$, mientras que el PDGF-DD se une principalmente al PDGFR- $\beta\beta$ (Reigstad *et al*, 2005).

Los PDGFRs se expresan en los precursores eritroides y mieloides de la médula ósea, así como en los monocitos, megacariocitos, fibroblastos, células endoteliales, osteoblastos y células de la glía (Board *et al*, 2005). Poseen actividad TK y se autofosforilan tras la unión al ligando. Tras dicha unión, el PDGFR interactúa con otras proteínas citoplasmáticas que contienen dominios SH2, incluyendo la fosfolipasa C, la proteína activadora de la GTPasa de *ras*, la PI3K, los miembros de la familia TK *pp60src*, la tirosina fosfatasa SHP-2 y los transductores y activadores de la vía de señalización Janus quinasa (citocinas transductoras no dependientes de receptor de la señalización de la vía JAK-STAT; Heldin *et al*, 1999).

Como segundos mensajeros se incluyen el I3P y el diacilglicerol, la liberación de calcio intracelular, PKC ($-\alpha$, $-\beta$, $-\varepsilon$, $-\zeta$) y las proteínas G de bajo peso molecular preniladas, es decir proteínas que adquieren un grupo hidrofóbico (3-metil-2-buten-1-il) que permite su más fácil adhesión a la membrana plasmática de la célula (Massy *et al*, 1999; Figura 16). En el núcleo, la vía de señalización de PDGF activa varios protooncogenes y los genes de respuesta temprana como *c-fos*, *JunB*, *c-myc* y *egr-1* (Granger *et al*, 2000) que son efectores del PDGFR y responsables de sus funciones celulares (Schmahl *et al*, 2007).

II.3.6.3. Implicación en el desarrollo tumoral

En el RMS, se ha demostrado la activación autocrina del PDGF mediante la coexpresión del PDGFR- α y PDGF-C (Heldin CH *et al*, 2012).

Se ha sugerido la función del PDGF en el desarrollo de la angiogénesis y el control de la presión intersticial tumoral (Pietras *et al*, 2001). Aunque no sea un fenómeno generalizado, algunos estudios han demostrado que los ligandos de PDGF y sus receptores se hallan implicados en los cánceres humanos a través de la estimulación autocrina del crecimiento tumoral (Yu *et al*, 2003).

Se ha evidenciado la implicación de la señalización de PDGF en los tumores del estroma gastrointestinal (GIST), gliomas, leucemia mielomonocítica crónica y cáncer de piel no melanocítico (Baxter *et al*, 2002; Heinrich *et al*, 2003).

De especial interés resulta un estudio en concreto que considera al PDGF-BB presente en el suero sanguíneo un posible marcador de nódulos linfáticos metastatizados, de modo que dicho factor actúe como herramienta diagnóstica en la evaluación primaria del cáncer esofágico. De esta forma la determinación de PDGF-BB en suero podría tener valor diagnóstico o pronóstico e incluso serviría para evaluar la enfermedad (Krzystek-Korpacka *et al*, 2011).

II.3.6.4. Estrategias terapéuticas

Se han desarrollado en los últimos años diferentes agentes antitumorales inhibidores de PDGF, siendo los más representativos, los ilustrados en la Tabla 13.

Tabla 13. Inhibidores de PDGF.

Agente	ITK	PDGFR	Referencia
Imatinib (STI 157)	X	X	
Sorafenib (BAY 439006)	X	X	
Sunitinib (SY11248)	X	X	Metzer <i>et al</i> , 2007
Leflunomida (SU101)	X	X	
Midostaurina (PKC412)	X	X	
Semaxanib (SU5416)	X	X	Heymach <i>et al</i> , 2004
Vatalanib (PTK787)	X	X	Jost <i>et al</i> , 2006; Los <i>et al</i> , 2007
AG013736	X	X	Wilmes <i>et al</i> , 2007; Spano <i>et al</i> , 2008
CDP860		X	
CP673,451	X	X	
SU6668	X	X	Laird <i>et al</i> , 2000
ITK= inhibidor TK			

II.4. AGENTES INDUCTORES DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR COMO AGENTES ANTITUMORALES

Existe una relación compleja entre los procesos celulares que regulan la proliferación, diferenciación, expresión génica y transformación neoplásica. La diferenciación celular representa una forma de control negativo de la proliferación y existe una red de moléculas que interactúan para producir el balance correcto entre la diferenciación y la proliferación. La transformación neoplásica no anula el potencial de las células para diferenciarse, por lo que la terapia basada en la inducción de la diferenciación alterará las características del tumor hacia un estado de transición inestable (Szallasi *et al*, 2000). Esta terapia se enfoca teniendo en cuenta que el cáncer es un estado reversible con el proceso de maduración alterado, en el que el fenotipo transformado puede ser suprimido mediante agentes citostáticos y diferenciadores farmacológicos y dirigido hacia formas benignas sin potencial proliferativo (Gómez-Vidal *et al*, 2004).

II.4.1. Los retinoides

Los retinoides son análogos naturales y derivados sintéticos de la vitamina A (retinol) que ejercen efectos inhibidores de la proliferación y antitumorigénicos en muchos tipos celulares (Tighe *et al*, 2004; Fritz *et al*, 2011). El ácido retinoico (RA) es el derivado natural de la vitamina A más potente y es esencial en diversas funciones biológicas como la proliferación, reproducción, desarrollo embrionario, diferenciación de tejidos epiteliales y en la respuesta inmunitaria (Langston *et al*, 1994; Bushue *et al*, 2010).

En el interior celular, el ácido retinoico (RA) se produce a partir de la vitamina A (retinol) a través de una vía enzimática de dos pasos que oxida el retinol a retinaldehído (retinal) de manera reversible y posteriormente, de manera irreversible, el retinal a RA.

La oxidación de retinol a retinal requiere la actividad de varias enzimas alcohol deshidrogenasa (ADHs) y retinol deshidrogenasas (RDHs). En cambio, la

oxidación de retinal a RA precisa de retinal deshidrogenasas (RALDHs), siendo éste el paso clave limitante de la biosíntesis del RA. El RA sintetizado es catabolizado en el citoplasma por los enzimas del citocromo P450 denominados CYP26, CYP3A y CYP2C (Thatcher *et al*, 2009; Bushue *et al*, 2010). Dado el amplio acceso al retinol a través del torrente sanguíneo que poseen las células, es posible que todas las células establezcan un equilibrio entre el retinol y el retinal, pero sólo las células que expresen los RALDHs pueden oxidar el retinal accesible a RA. El RA liberado por las células que lo sintetizan puede penetrar en las células adyacentes con dos posibles destinos. En las células que expresan los genes de la familia de CYP26, se cataboliza y, por tanto, su vía de señalización se trunca (Hernández *et al*, 2007). En las células que no expresan CYP26, puede entrar al núcleo y activar la transcripción génica. Además, algunas células expresan proteínas de unión al RA (CRBPs) y lo disponen para su transporte nuclear (Sessler *et al*, 2005; Bushue *et al*, 2010).

El RA no se produce en todos los tipos celulares ni en todos los estadios del desarrollo, sino que tiene un patrón de producción espacio-temporal específico. El retinol es secretado por el hígado y transportado por la sangre a niveles micromolares mediante proteínas séricas de unión al retinol (RBPs) y se pone a disposición celular al oxidarse a retinaldehído (Quadro *et al*, 1999; Fritz *et al*, 2011). Gran cantidad de células poseen STRA6, receptor transmembrana de las RBPs que facilita la incorporación del retinol (Kawaguchi *et al*, 2007).

II.4.1.1. Ácido all-trans retinoico (ATRA)

II.4.1.1.1. Estructura y funciones

Existen varias isoformas naturales del RA en humanos siendo la más activa y abundante el ácido trans-retinoico o ATRA (*all-trans retinoic acid*); otras isoformas, en menor concentración son el 9-cis-RA, el 11-cis-RA, 13-cis-RA y 9,13-discis-RA (Thatcher *et al*, 2009; Fritz *et al*, 2011).

En relación al ATRA, se han propuesto dos modelos de acción y metabolismo de esta molécula; uno de ellos es el autocrino, en el que el ATRA es

sintetizado, se une al receptor y se metaboliza en la misma célula (Napoli *et al*, 1996). El segundo modelo es el paracrino, en el que el ATRA es sintetizado en una célula y se dirige a un tejido diana con receptor específico donde ejerce su actividad o, por el contrario, se dirige a un tejido no diana donde es metabolizado (Duester *et al*, 2008).

Datos epidemiológicos, así como estudios en animales, demuestran que el ATRA resulta esencial para una amplia variedad de procesos biológicos que incluyen el desarrollo y mantenimiento de la placenta y la embriogénesis, la regeneración de la piel y las células epiteliales, la regulación de la apoptosis y el mantenimiento y regulación de la respuesta inmune (Tzimas *et al*, 2001; Marill *et al*, 2003; Bushue *et al*, 2010). Así, actúa del mismo modo que los factores de crecimiento en determinados procesos del desarrollo, como la neurogénesis, la cardiogénesis y el desarrollo de las extremidades anteriores, el intestino anterior y el ojo (Duester *et al*, 2008; Klemann *et al*, 2009; Figura 8).

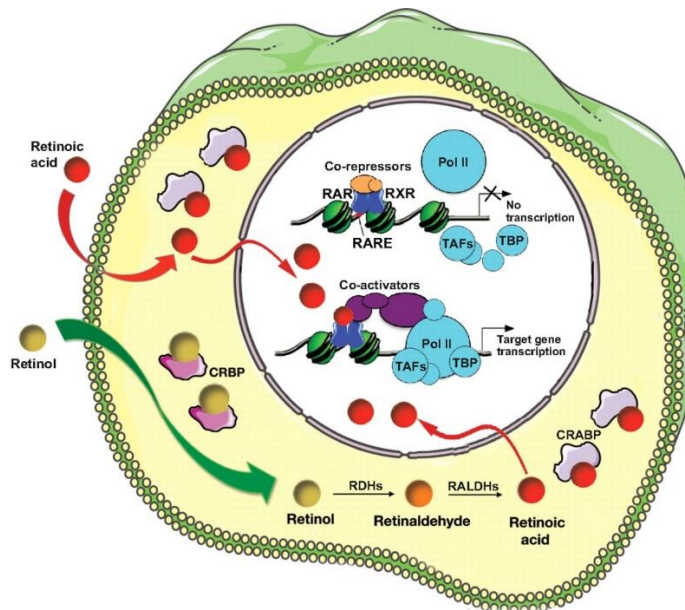


Figura 8. Actividad intracelular del RA. Tomado de www.dev.biologist.org en Junio de 2012.

II.4.1.1.2. Vía de señalización

Estudios recientes indican que el ATRA inhibe diversas vías de señalización de los FC (Duester *et al*, 2008; Fritz *et al*, 2011), e interviene también en los procesos de transcripción génica.

El ATRA se incorpora en la célula por difusión simple o por la conversión del retinol absorbido del tracto gastrointestinal, el cual, en forma circulante, se encuentra unido a proteínas RBPs e intracelularmente a las proteínas CRBPs.

El ATRA puede ser metabolizado de forma inmediata mediante la unión a las proteínas CRBPs y oxidado en el retículo endoplasmático mediante la acción de las enzimas dependientes del citocromo P450 (CYPs – cytochrome P450 enzymes). Alternativamente, el ATRA y su isómero 9-cis-RA, pueden entrar en el núcleo y unirse a los receptores nucleares RAR y RXR, respectivamente. A continuación, se produce la activación de los receptores mediante la formación del heterodímero RAR-RXR o el homodímero RXR-RXR.

De esta forma se unen a regiones muy afines del ADN o elementos RARE (elementos de respuesta al RA), que normalmente se encuentran en la zona del promotor de un determinado gen, activando su transcripción (Njar *et al*, 2006).

Los diversos efectos biológicos de los retinoides sobre la expresión génica están mediados por 6 receptores nucleares (RAR α , RAR β y RAR γ , RXR α , RXR β y RXR γ), los cuales son factores de transcripción dependientes de ligando y miembros de la superfamilia de los receptores de las hormonas esteroideas/tiroideas (Chawla *et al*, 2001; Bushue *et al*, 2010). Estos receptores nucleares activan la transcripción uniéndose, en forma de heterodímeros RAR/RXR, a las secuencias RAREs localizadas en la región promotora de los genes diana o como homodímeros RXR/RXR a las secuencias RXREs (Figura 33 A). El ATRA puede unirse al receptor RAR pero no tiene afinidad por el RXR; sin embargo, el 9-cis-RA es capaz de unirse a los dos tipos de receptores (Simeone *et al*, 2004). Estudios recientes han demostrado la existencia de un tercer tipo de receptor para el ATRA, la familia de receptores huérfanos para

retinoides (ROR), compuestos por los tipos ROR α , ROR β y ROR γ . Son receptores nucleares que tienen actividad transcripcional al unirse a elementos de respuesta a RORs cromatínicos (ROREs). ROR β presenta gran afinidad por el ATRA, y cuando se produce dicha unión, el ATRA reduce su actividad transcripcional, pero al unirse al ROR γ inhibe completamente su actividad (Jetten *et al*, 2009).

Cuando el RA se une al receptor, se produce un cambio de conformación en la zona de unión al ligando, de forma que las moléculas activadoras sustituyen a los inhibidores y se produce la apertura de la hebra de cromatina y la activación de la transcripción del gen asociado (Soprano *et al*, 2004). En ausencia de RA, se produce la unión de la secuencia RARE y, el promotor del gen y el receptor RAR se unen a supresores, los cuales producen efectos transcripcionales negativos en el gen diana, a través de la producción de cambios en la estructura de la cromatina.

En muchos tejidos se encuentran habitualmente niveles altos del ARNm del receptor RAR α ; sin embargo, dependiendo del tipo tisular, la expresión del receptor RAR β es más específica. Los tres tipos de receptores RXR se expresan ampliamente en gran variedad de tejidos adultos; como mínimo una de las isoformas está presente en todos los tejidos examinados hasta el momento.

Una adecuada expresión de los receptores es fundamental para la regulación de los procesos celulares. De hecho, alteraciones en dicha expresión se asocian con el desarrollo de diversos tumores. Por ejemplo, en la leucemia promielocítica, -donde más se ha empleado la terapia basada en retinoides obteniendo remisión-, se han observado traslocaciones en el gen RAR α . Estas traslocaciones dan lugar a proteínas de fusión que no responden a las concentraciones fisiológicas del RA (Soprano *et al*, 2004; Fritz *et al*, 2011). Asimismo, en otros tumores sólidos, como el carcinoma de pulmón, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y en el cáncer de mama, se ha observado una pérdida de la expresión del receptor RAR β , el cual se sobreexpresa en células epiteliales mamarias normales. Estas evidencias sugieren que la expresión del receptor RAR β

juega un papel importante en los efectos antiproliferativos de los retinoides (Simeone *et al*, 2004; Bushue *et al*, 2010).

II.4.1.1.3. Actividad antitumoral

El ATRA ejerce su actividad antineoplásica mediante tres procesos principales (Garattini *et al*, 2004), la diferenciación celular, la inhibición del crecimiento/proliferación y la inducción de la apoptosis. Además, se conocen sus efectos sobre multitud de factores de transcripción mediante su fosforilación, como el CREB, la quinasa activada por mitógeno ERK1/2, la JNK y el p38 (Shinozaki *et al*, 2007; Chen *et al*, 2008). También inhibe la activación de AP1 a través de la inhibición de la inducción de *c-jun* y *c-fos* (Fisher *et al*, 2000). Estudios recientes han demostrado que el RA regula otros receptores nucleares, como los receptores activados por inductores proliferativos de peroxisoma (PPAR), el receptor de la vitamina D y el receptor X hepático que heterodimeriza con RXR regulando, de este modo, la activación de numerosos factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y STAT-1 (Schug *et al*, 2007). El RA puede ejercer también efectos inhibidores sobre el crecimiento celular, a través de la activación alternativa de RARs *versus* PPAR β/δ (Mucida *et al*, 2009).

El mecanismo principal por el cual el ATRA inhibe la proliferación celular consiste en la detención del ciclo celular en la fase G1. Existen varios moduladores del ciclo celular, los cuales median la transición de la fase G1 de reposo a la fase S de síntesis. Entre éstos, se encuentran la proteína del pRb, (supresor tumoral), las ciclinas D y E, las ciclinas dependientes de kinasas (cdks) 2, 4 y 6 y sus inhibidores, p15, p16 y p21. El efecto inhibidor de la proliferación del ATRA se ha relacionado con su capacidad para disminuir la expresión de la ciclina D1 y D3, la actividad de cdk2 y cdk4 y la expresión y fosforilación de pRb. También los inhibidores de las cdk pueden estar regulados por el ATRA como se ha visto en el caso del p21.

Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con retinoides induce en las células tumorales la formación de metabolitos reactivos del oxígeno (MROs)

(Castro *et al*, 1996; Fritz *et al*, 2011), los cuales pueden producir daño oxidativo en el ADN y mediar en el proceso apoptótico (Matés *et al*, 2000; Fritz *et al*, 2011). Además, diversos estudios relacionan al RA con la inducción de TRAIL (ligando del factor de necrosis tumoral inductor de apoptosis) y la caspasa 8 (Jiménez-Lara *et al*, 2004; Fritz *et al*, 2011), la disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y una inducción de la proteína proapoptótica p53 tras el tratamiento con RA en células tumorales prostáticas (Pasquali *et al*, 1999).

El RA también se ha visto implicado en otros procesos celulares que son relevantes para su utilización en terapias antitumorales. Así, tras el tratamiento con RA se ha obtenido un incremento en las uniones intercelulares tipo GAP (las cuales se van perdiendo durante el proceso de carcinogénesis) (Carystinos *et al*, 2001); una inhibición de la expresión de los receptores de superficie celular para integrinas (Chattopadhyay *et al*, 1999) y MMTs de la MEC como la colagenasa, las cuales aumentan la capacidad invasiva de las células tumorales (Guérin *et al*, 1997).

II.4.1.2. Retinoides sintéticos

El retinoide natural más utilizado en las terapias antitumorales es el ATRA puesto que es más activo que su isómero 9-cis-RA. Sin embargo, estas moléculas actúan de forma global en el organismo (sus receptores se encuentran en prácticamente todos los tipos tisulares analizados) por lo que se asocian a su tratamiento efectos secundarios como la hiperlipidemia y la toxicidad mucocutánea y hepática (Sutton *et al*, 1997; Bushue *et al*, 2010).

Por este motivo, se han desarrollado retinoides sintéticos con una actividad más específica y con mayor potencia, lo que disminuye la toxicidad de los retinoides naturales. Los principales retinoides sintéticos utilizados hasta el momento son el LGD1069 (bexaroteno, targretina), un derivado sintético del retinoide 9-cis-RA y la N-(4-hydroxyphenyl) retinamida (4-HPR, fenretidina), derivado sintético del ATRA (Simeone *et al*, 2004; Bushue *et al*, 2010; Tabla 14).

Tabla 14. Agentes inductores de la diferenciación utilizados en las terapias antitumorales (adaptada de Simeone *et al*, 2004; Fritz H. *et al*, 2011).

Nombre Comercial	Retinoide	Actividad	Aplicación Terapéutica
Treitonina	Transretinoico	RAR	Leucemia promielocítica Keratosis actínica
Alitreitonina Panretina	Ácido retinoico 9-cis	RAR	Sarcoma de Kaposi
Isotretionina	Ácido retinoico 13-cis	RAR	Leucoplaquia oral Cáncer de piel Carcinoma de cabeza y cuello (con IFN α -2a) Neuroblastoma
Bexaroteno	LDG1069	RXR RAR residual	Linfoma cutáneo de las células T (estadios IA-IB, IIA)
Fenretidina (4-HRP)	4-hydroxy phenylretinamida	RAR γ RAR β Otras	Cáncer de mama secundario
Retinoide acíclico	Ácido poliprenoico	RAR RXR PPAR	Carcinoma hepatocelular (prevención)
Adapaleno CD271		RAR γ RAR β (baja)	Neoplasia intraepitelial cervical (prevención)
Tamibaroteno	AM80	RAR α/β >> γ	Leucemia promielocítica aguda

Los RA se han asociado a otros compuestos para aumentar su eficacia clínica. Se han desarrollado terapias que combinan a los retinoides con la quimioterapia, butirato sódico y tricotatina A (inhibidores de las desacetilasas de las histonas, las cuales ejercen un efecto inhibitor de la acción del receptor del RA) (Lin *et al*, 1998), trióxido arsénico (el ATRA actúa de forma sinérgica con el trióxido arsénico para aumentar la capacidad antiproliferativa y proapoptótica del tratamiento en un proceso mediado por el GSH; Lin *et al*, 2005), interferones y tamoxifeno (Jiménez-Lara *et al*, 2004).

La aplicación en los sarcomas ha sido objeto de investigación por algunos grupos de investigación, puesto que se ha observado su efecto diferenciador y

antiproliferativo en células de RMS, tanto humanas como murinas (Barlow *et al*, 2005; Ricaud *et al*, 2005, Palomares *et al*, 2006).

Estos estudios reflejan una posible utilidad de los retinoides en el tratamiento del RMS, pero también exponen la necesidad de conocer previamente la reactividad de las células tumorales al tratamiento, puesto que se han encontrado tipos celulares que no responden al RA (Castro *et al*, 2002; Palomares *et al*, 2006), lo que podría ser debido a disfunciones en los receptores de los retinoides (traslocaciones y formación de nuevas proteínas de fusión que impiden la respuesta al tratamiento; Ricaud *et al*, 2005).

El RMS no metastático presenta, en la actualidad, un pronóstico favorable. Sin embargo, el RMS metastático presenta una tasa de curación muy baja debido al desarrollo de resistencia al tratamiento antitumoral.

Los FCs juegan un papel fundamental en la biología tumoral y pueden ser un posible mecanismo de incremento de la quimiorresistencia del tumor.

Los agentes inductores de la diferenciación son capaces de sensibilizar a las células tumorales al tratamiento quimioterápico habitual y podrían también aumentar la eficacia del tratamiento convencional del RMS. Estos agentes son candidatos terapéuticos para la reversión del efecto protumoral ejercido por los FCs, en la eficacia de la quimioterapia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

III.1.1. Células tumorales

En el estudio se ha utilizado la línea celular de rabdomiosarcoma de rata S4MH (Figura 9).

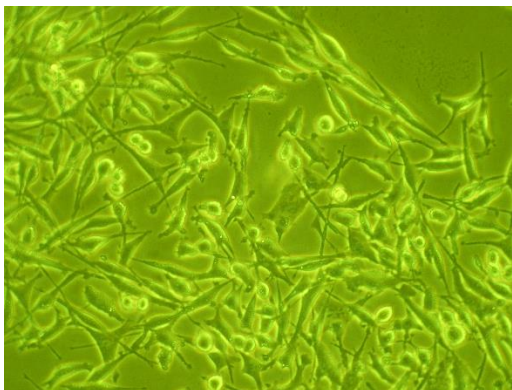


Figura 9. Línea celular S4MH; imagen obtenida con microscopio a 20X.

La línea proviene del laboratorio de inmunopatología del Centro Nacional de Investigaciones científicas (CNRS, Villesuif, Paris), donde se indujo el tumor mediante la inyección intramuscular de níquel en ratas WAG. El tumor se dispuso en cultivo y las células parentales obtenidas fueron clonadas de forma que se obtuvieron diferentes líneas celulares para estudio. El método empleado aseguró un origen monocelular de las líneas celulares.

La línea celular S4MH presenta una morfología indiferenciada y una elevada capacidad metastática. La inoculación de estas células en ratas WAG por vía intravenosa o subcutánea provoca la formación de metástasis en hígado, pulmón y ganglios linfáticos.

III.1.2. Cultivos celulares

Las células tumorales S4MH muestran un fenotipo adherente. Cuando los cultivos alcanzaban la semiconfluencia, las células eran despegadas de la superficie del frasco por medio de un breve tiempo de exposición a EDTA 2 mM en PBS y

sembradas en el soporte y la concentración más adecuados según la experiencia a realizar.

En todas las experiencias se comprobó la viabilidad celular mediante el test de exclusión de azul tripan (Gibco BRL), excluyendo el cultivo si la viabilidad era menor del 95-98%. Para los diferentes experimentos se utilizaron siempre los cultivos teniendo en cuenta el número de veces que se habían subcultivado desde su descongelación, de tal forma que sólo se utilizaron las células hasta pase 5.

III.1.2.1. Frascos y placas de cultivo

El mantenimiento de la línea celular fue realizado en frascos de cultivo de 25 y 75 cm² de superficie (Orange Scientific, Vertex Technics, S.L.) y en placas de cultivo de 24 pocillos (Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, USA).

III.1.2.2. Medios de cultivo

Las células tumorales S4MH fueron cultivadas en DMEM (Dubelcco's modified Eagle's médium, Gibco BRL) al que se añadió penicilina (100 UI/ml, Biochrom KG), estreptomicina (100 µg/ml, Biochrom KG) y anfotericina B (100 µg/ml, Biochrom KG). Además, el medio de cultivo de las células tumorales fue suplementado con un 15% de suero bovino fetal (SBF, Biochrom KG).

III.1.2.3. Soluciones tamponadas

En los distintos estudios experimentales se utilizaron las siguientes soluciones tamponadas:

- Tampón fosfato en solución salina (PBS, del inglés phosphate buffered saline) a pH 7.3, utilizado en la manipulación de los cultivos celulares.
- PBS-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 2 mM. Se utiliza para separar las células adherentes de la base del frasco de cultivo.

III.1.3. Fármacos

Para todas las experiencias, las disoluciones de los fármacos empleados fueron preparadas en el momento de realizar el estudio.

III.1.3.1. Melfalán

El melfalán (Sigma-Aldrich) es un agente antiproliferativo que actúa a nivel genómico. Su mecanismo de acción se basa en la formación de entrecruzamientos intracatenarios por alquilación bifuncional en las secuencias 5'-GGC. Su estructura química viene ilustrada en la Figura 10. Se administra en dosis de 6-8 mg/m², en tumores como RMS, sarcoma de Ewing, mieloma múltiple, neoplasias del epitelio ovárico, etc.

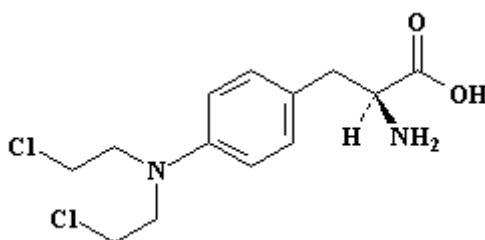


Figura 10. Estructura química del melfalán. Tomado de www.answers.com en Junio de 2012.

Para las experiencias, se estableció la concentración de almacenaje de 1mg/ml que se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso en las mismas. Se realizaron alícuotas de esa concentración para su uso en el cultivo en un rango entre 1 y 10 µM.

III.1.3.2. Vincristina (VCR)

La VCR (Sigma-Aldrich) es un alcaloide vegetal que produce una inhibición de la monoamina oxidasa B (Horio M. *et al*, 1998), provocando la parada del ciclo celular en la fase G2/M. Produce una inhibición del ensamblaje de los microtúbulos, ya que se une a la tubulina e induce la formación de agregados espirales entre los microtúbulos. Es utilizada en RMS, tumores de Wilms, neuroblastoma, sarcoma de Ewing y en diferentes tipos de leucemias y linfomas. Suministrada en forma de

polvo liofilizado de sulfato de VCR que carece de color o ligeramente amarillento, se reconstituye con metanol a una concentración de almacenaje a -20°C de 20 mg/ml. Su estructura química se presenta en la Figura 11.

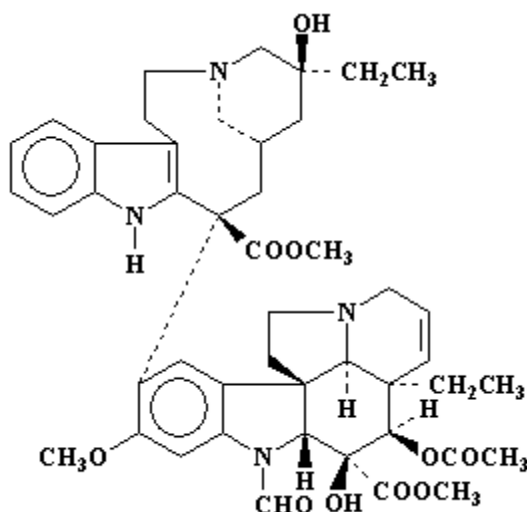


Figura 11. Estructura química de la VCR. Tomado de www.answers.com en Junio de 2012.

Se realizó el alicuotado del mismo para obtener la concentración de almacenaje y se mantuvo a -20°C hasta su utilización para los ensayos, en los que se usó un rango de concentraciones de 1 a 10 ng/ml.

III.1.3.3. Actinomicina D (ACD)

La ACD (Sigma-Aldrich) es un antibiótico antineoplásico obtenido mediante purificación de *Actinomices*. Inhibe la proliferación celular a través de la formación de un complejo estable de unión con el ADN al intercalarse con la guanina, detiene, de este modo, la síntesis de ADN y ARN. Se emplea en RMS, sarcoma de Ewing, retinoblastoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, tumores testiculares, coriocarcinoma, etc. El producto se presenta en formato polvo de color rojizo, se disolvió en DMSO para obtener una concentración de almacenaje de 1mg/ml a -20°C (Figura 12). En los ensayos, se utilizó un rango de concentraciones de 1 a 50 ng/ml.

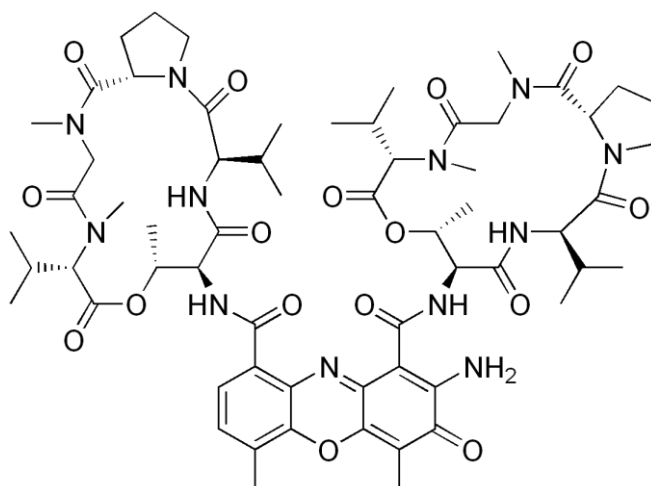


Figura 12. Estructura química de la ACD. Tomado de www.wikipedia.org en Junio de 2012.

III.1.3.4. Ácido *all trans* retinoico (ATRA)

El ATRA (Sigma-Aldrich Chemical Co.) es un derivado natural de la vitamina A, inductor de la diferenciación celular e inhibidor de la proliferación –a través de la detención del ciclo celular en fase G1–. Su estructura química se muestra en la Figura 13.

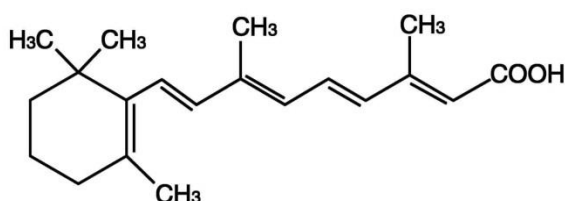


Figura 13. Estructura química del ATRA. Tomado de www.hfchem.cn en Junio de 2012.

Este producto se presenta en polvo, que se almacena en oscuridad a -20°C . Se disuelve en etanol al 70%. La solución madre se almacena a -20°C , protegida de la luz y con una duración máxima de un mes. Se realizó el alicuotado del mismo para la concentración de trabajo en un rango de entre 1 y $10\ \mu\text{M}$.

III.1.5. FACTORES DE CRECIMIENTO (FC)

Todos los FC fueron suministrados por la casa Sigma-Aldrich Chemical Co.

III.1.5.1. Factor de crecimiento hepatotrófico (HGF)

Para el estudio se utilizó HGF recombinante humano. Se presenta en vial conteniendo 5 mg de producto liofilizado y se almacena a -20°C. Se reconstituyó el contenido del vial en agua destilada hasta una concentración de 5 mg/ml. Esta solución se diluyó en PBS hasta obtener alícuotas de 1 mg/ml, que fueron almacenadas a -20°C para su uso. El rango de concentración de trabajo utilizado fue de 5-15 ng/ml.

III.1.5.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

En nuestros experimentos, se utilizó VEGF recombinante de rata que presenta un 88% de homología con el VEGF humano. Se proporciona como 10 µg de proteína liofilizada, que se reconstituye en PBS, conteniendo un 0.1% de suero de albúmina bovina (BSA, GE Healthcare UK Limited), obteniendo alícuotas con una concentración final de 1 µg/ml, que fueron congeladas a -20°C. La concentración de trabajo utilizada fue de 5-40 ng/ml.

III.1.5.3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

En la experimentación se utilizó EGF recombinante humano. El producto se presenta en vial en polvo y se reconstituyó en ácido acético 10 mM hasta 1 mg/ml. Se prepararon alícuotas de 20 µg/ml, para lo cual fue necesario la adición de 0.1% de BSA, y se almacenaron a -20°C. Se utilizó una concentración de 5-100 ng/ml.

III.1.5.4. Factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2)

En la experimentación se utilizó IGF-2 recombinante murino, el cual comparte un 91% de homología con el humano. El producto se presenta en vial en una solución filtrada al 30% de acetonitrilo y 0,1% de TFA y se reconstituyó en PBS la 0,1% de albúmina sérica humana. Se prepararon alícuotas a 1µg/ml y se almacenaron a -20°C. La concentración de trabajo empleada fue de 5-100 ng/ml.

III.1.5.5. Factor de crecimiento plaquetario (PDGF-BB)

Este factor se presenta en forma liofilizada en una solución filtrada de 30% de acetonitrilo con 0,1% de trifluoroacético. Se reconstituye el contenido del vial usando 1 ml de ácido clorhídrico 4 mM que contiene BSA al 0,1% y 01% de albúmina sérica humana también al 0,1%, para obtener una solución incolora que se almacena en las alícuotas a 1 µg/ml a -20°C. La concentración de trabajo utilizada fue de 5-40 ng/ml.

III.1.5.6. Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF_b)

El FGF_b es un potente agente mitogénico con un peso molecular de 16.4 kDa que se presenta liofilizado y es reconstituido en fosfato sódico 25 mM y cloruro sódico 50 mM a pH 7.0, pudiendo así adicionarlo al medio de cultivo normal y realizar las consiguientes alícuotas a una concentración de 1 µg/ml para su preservación a -20°C. La concentración de trabajo empleada fue de 1-50 ng/ml.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. Cultivos celulares

III.2.1.1. Descongelación y mantenimiento de las células S4MH

Se realiza la descongelación rápida del criovial (Corning Incorporated Costar) en baño a 37°C. La manipulación de los cultivos celulares se realizó en cabinas de flujo laminar horizontal (Bio 48 Faster). Una vez descongelado el criovial, las células fueron cultivadas inmediatamente en frascos de 25 cm² en medio DMEM suplementado con penicilina (100 UI/ml)-estreptomicina (100 µg/ml) y SBF al 15%. Una vez realizada la siembra se mantuvieron en un incubador (CO₂ incubator MCO-18AIC-UV, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd) ajustado a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂, durante 1,5–2 horas. A continuación, se verificó la adhesión celular y se añadió medio de cultivo fresco.

III.2.1.2. Congelación de las células S4MH

Con el fin de crear un stock suficiente de células, se procedió a la congelación del cultivo una vez llegado al estado de semiconfluencia. Se eliminó el medio de cultivo y se realizó el lavado celular con PBS 1X.

Las células fueron despegadas de la superficie del frasco mediante su exposición a PBS-EDTA 2 mM durante un máximo de 5 minutos, se añadió de nuevo medio de cultivo con el objetivo de detener el efecto del PBS-EDTA y se recogió el contenido de los frascos en un tubo para su centrifugación a 1500 r.p.m. (Function Labofuge 400R, Heraeus, Germany), durante 5 minutos. A continuación se realizó un recuento celular y se ajustó la concentración a 10^6 células/ml en SBF y 10% del agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO). Las células se dispusieron en crioviales (10^6 células/criovial) de 1 ml de capacidad. La congelación se produjo de manera paulatina, en primer lugar a -20°C durante 1,5-3 horas y a -80°C durante el resto del proceso de congelación (ultra-low temperature freezer MDF-U52V SANYO Electric Biomedical Co., Ltd) y se mantuvo esta temperatura hasta su almacenaje en nitrógeno líquido o hasta el momento de la descongelación.

III.2.1.3. Siembra de las suspensiones celulares en placas

Una vez obtenidos los cultivos celulares semiconfluentes, se retiró el medio de cultivo del frasco y, posteriormente, se incubaron las células en una solución de PBS-EDTA 2 mM, durante 5 minutos a 37°C . Se añadió medio de cultivo y se recogió la suspensión celular en tubos de centrifuga. Estos tubos se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a 20°C . Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en medio de cultivo.

El recuento celular se realizó en un hemocitómetro Burkert[®] (Blau Brand, Germany), determinándose la viabilidad celular por el método de exclusión del azul tripán (Gibco BRL[™]). En todos los ensayos realizados la viabilidad mínima fue del 95%.

Para los diferentes experimentos se utilizaron siempre los cultivos teniendo en cuenta el número de veces que se habían subcultivado desde su descongelación, de tal forma que solamente se utilizaron las células hasta pase 5.

III.2.1.4. Determinación de la proliferación celular

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos, a una densidad de 10^4 células por pocillo en medio de cultivo (1 ml/pocillo) suplementado con un 10% de SBF.

Aplicación de los tratamientos: las placas son sembradas 24 horas antes de iniciar el ensayo para permitir la adhesión de las células y acondicionamiento del medio. Pasadas esas 24 se adicionaron los tratamientos correspondientes según el estudio a realizar, considerándose este momento las 0 horas. Finalizado el tiempo de incubación de cada fármaco, se procedió a su retirada y sustitución por medio de cultivo fresco. Las células se mantuvieron en este medio hasta el final del experimento.

Medidas de proliferación celular: la proliferación celular fue determinada a las 0, 24, 48 y 72 horas. Para ello, una vez eliminado el medio de cultivo de los pocillos se añadió la solución PBS-EDTA 2mM y se dispusieron a 37°C durante 3 minutos. Una vez despegada la población celular por completo, se realizó un recuento directo al microscopio mediante la utilización de un hemocitómetro **Burker®**.

Para la cuantificación de la proliferación celular y valoración de la influencia de los fármacos sobre la misma, se utilizaron los siguientes parámetros:

a) El índice de proliferación (IP)

El IP se calculó comparando el recuento celular obtenido con cada tratamiento y tiempo, con el obtenido en el caso del control al mismo tiempo, estableciendo, por tanto, un valor que informa del número de veces que un

determinado tratamiento aumenta o disminuye la proliferación respecto al control a un tiempo determinado, según la fórmula:

$$IP = \frac{N^{\circ} \text{ Céls tratamiento en el tiempo } t}{N^{\circ} \text{ Céls control en el tiempo } t}$$

b) La cinética proliferativa (CP)

Para la evaluación de la CP se calculó para cada tiempo y tratamiento el cociente entre el número de células existentes a un tiempo t en relación al número de células que había en el tiempo anterior de la curva. Así, para determinar la cinética proliferativa del periodo 0-24 horas, se calcula el cociente entre el número de células a tiempo 0. El valor obtenido da idea de la pendiente en los diferentes tramos de la curva de proliferación.

$$CP = \frac{N^{\circ} \text{ Céls en el tiempo } t}{N^{\circ} \text{ Céls en el tiempo } t - 24}$$

c) El Ratio Cinético Proliferativo (ratio CP)

El ratio CP se calculó comparando la cinética proliferativa obtenida con cada tratamiento y tiempo con la obtenida en el caso del control a los mismos tiempos, estableciendo así un índice que proporciona información sobre la velocidad de proliferación a cada intervalo de tiempo cuando se aplican los tratamientos en relación a la velocidad de proliferación de la población control.

$$ratio CP = \frac{CP \text{ tratamiento} = 24 \text{ h}}{CP \text{ control} = 24 \text{ h}}$$

d) El factor modificador de dosis (FMD)

Para conocer el efecto que produce la combinación del agente inductor de la diferenciación ATRA y el agente quimioterápico en la inhibición del crecimiento de la población celular respecto al tratamiento aislado de estos agentes, se calculó el FMD de acuerdo con la siguiente ecuación (Thrall *et al*, 1991):

$$FMD = \frac{\% \text{ inhibición causado por el tratamiento con el modulador+droga}}{\% \text{ inhibición causado por el modulador} + \% \text{ inhibición causado por la droga}}$$

donde, valores de FMD>1 indican sinergia entre los fármacos y valores entre 0 y 1 señalan efecto aditivo.

III.2.2. Procedimientos experimentales

En todos los ensayos se realizaron medidas para determinar el efecto de las diferentes condiciones aplicadas a los cultivos sobre la proliferación y cinética proliferativa de las células S4MH. El modelo de siembra y proliferación del control fue el que se puede observar en la Figura 14.

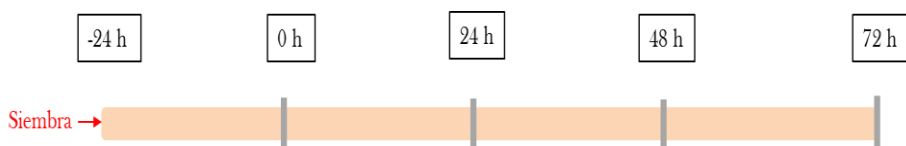


Figura 14. Secuencia temporal de los ensayos.

III.2.2.1. Estudio del efecto de los FC: HGF, VEGF, IGF-2, PDGF-BB, FGF_b y EGF

Las células S4MH fueron expuestas a diferentes concentraciones de FC con el fin de determinar la concentración óptima de cada uno de ellos según la pauta mostrada en la Figura 15. De este modo se utilizaron:

- HGF: 5, 7.5, 10, 15, 20, 30 y 40 ng/ml durante 72 horas, con 10% SBF.
- VEGF: 5, 10, 20, 30 y 40 ng/ml durante 72 horas, con 10% SBF.
- IGF-2: 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml durante 72 horas, con 10% SBF.
- PDGF-BB: 5, 10, 20, 30 y 40 ng/ml durante 72 horas, con 10% SBF.
- FGF_b: 5, 10, 20, 30 y 40 ng/ml durante 72 horas, con 10% y 7.5% de SBF.
- EGF: 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml durante 72 horas, con 10% y 7.5% de SBF.

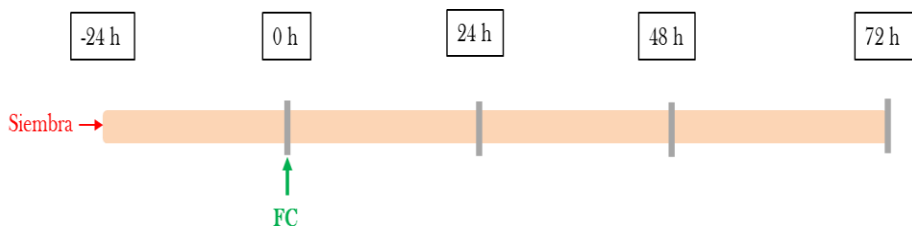


Figura 15. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los FCs.

III.2.2.2. Estudio del efecto del ATRA

Las células S4MH fueron tratadas con ATRA a una concentración de 10^{-6} M durante 72 horas, administrado en dos tiempos: a tiempo $t=0$ horas y a tiempo $t=48$ horas (Figura 16).

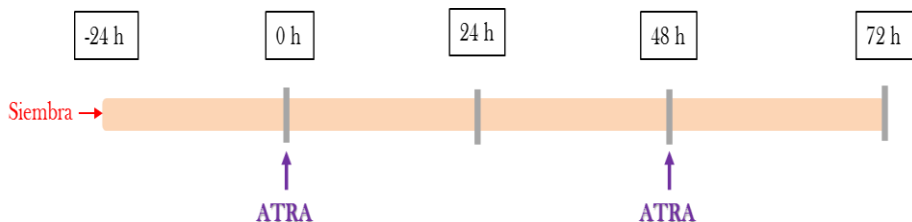


Figura 16. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con ATRA.

III.2.2.3. Estudio del efecto del ATRA en presencia de los FC

Las células S4MH en presencia de los FC a su concentración óptima, fueron tratadas con ATRA a una concentración de 10^{-6} M según la pauta mostrada a continuación (Figura 17).

- 10ng/ml HGF+ 10^{-6} M ATRA durante 72 horas, con 10% SBF.
- 10ng/ml VEGF+ 10^{-6} M ATRA durante 72 horas, con 10% SBF
- 10ng/ml IGF-2+ 10^{-6} M ATRA durante 72 horas, con 10% SBF
- 10ng/ml PDGF-BB+ 10^{-6} M ATRA durante 72 horas, con 10% SBF.
- 10ng/ml FGF_b+ 10^{-6} M ATRA durante 72 horas, con 7.5% SBF.
- 25ng/ml EGF+ 10^{-6} M ATRA durante 72 horas, con 7.5% SBF.

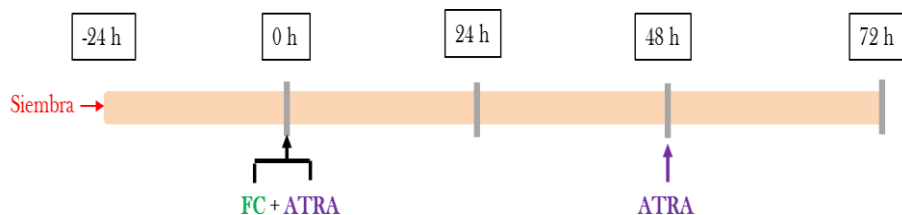


Figura 17. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los FC y el ATRA.

III.2.2.4. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD

Las células S4MH fueron tratadas con los fármacos a diferentes concentraciones para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), es decir, la concentración del fármaco que reduce el número de células del cultivo a la mitad a las 48 horas.

Los fármacos, las concentraciones y los tiempos de exposición utilizados fueron:

- Melfalán: 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M durante 1 hora.
- VCR: 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 ng/ml durante 1 hora.
- ACD: 1, 10, 15, 25 y 50 ng/ml durante 1 hora.

En estos ensayos experimentales, la adición de los fármacos se realizó a las 24 horas de la siembra celular, es decir, a $t=0$ horas. Transcurrido el período de exposición a la IC_{50} de cada fármaco (1 hora), se procedió a su retirada y sustitución por medio de cultivo fresco. Posteriormente, se procedió a valorar el efecto de los tratamientos sobre la proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas (Figura 18).

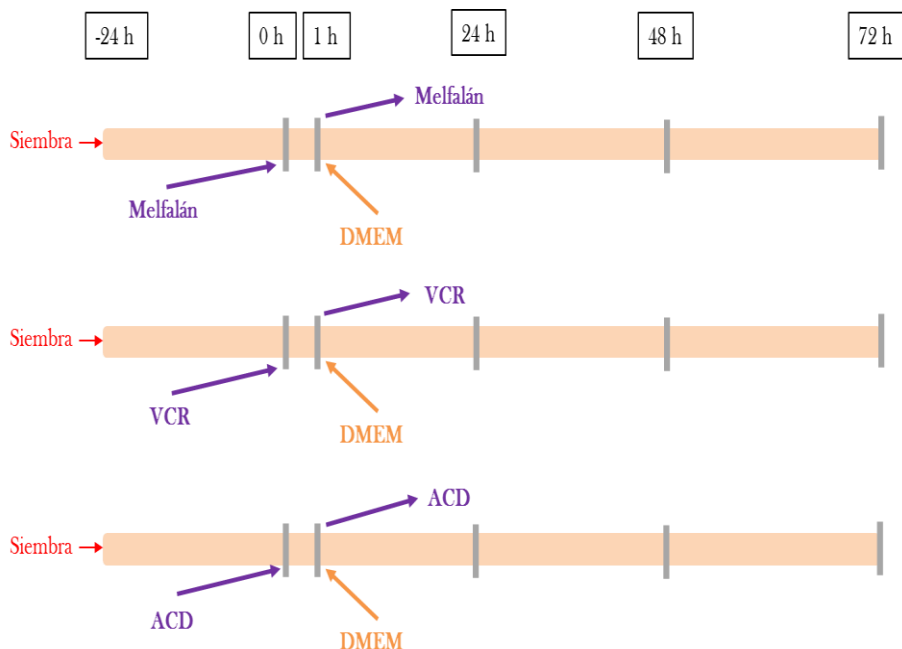


Figura 18. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los fármacos antitumorales.

III.2.2.5. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD en presencia de los FCs

Se estudió la influencia de la presencia de FC en el medio de cultivo sobre el efecto de los distintos tratamientos quimioterápicos a la IC_{50} respectiva. En estos ensayos experimentales la adición de los fármacos se realizó a las 24 horas de la siembra celular, es decir, a $t=0$ horas. Transcurrido el período de exposición a la IC_{50} de cada fármaco, se procedió a su retirada y sustitución por medio de cultivo fresco con el FC correspondiente. Las células se mantuvieron en presencia de los FC hasta el final del experimento (Figura 19).

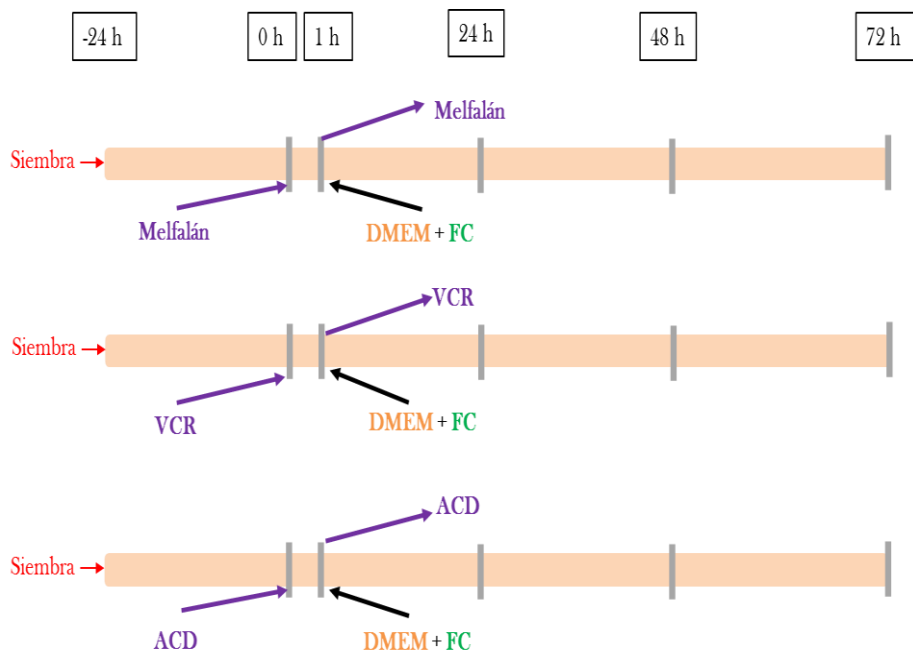


Figura 19. Pauta de tratamiento del cultivo de células S4MH con los fármacos antitumorales en presencia de los FC.

III.2.2.6. Estudio del efecto del melfalán, la VCR y la ACD en combinación con ATRA

En estos estudios se analizó el efecto del tratamiento combinado del ATRA con los agentes quimioterápicos sobre la línea celular S4MH. La adición de los fármacos se realizó a las 24 horas de la siembra celular. Transcurrido el tiempo de exposición a la IC_{50} de cada fármaco, se retiró el medio y se sustituyó por medio nuevo y ATRA. A las 48 horas, se repitió el tratamiento con ATRA (Figura 20).

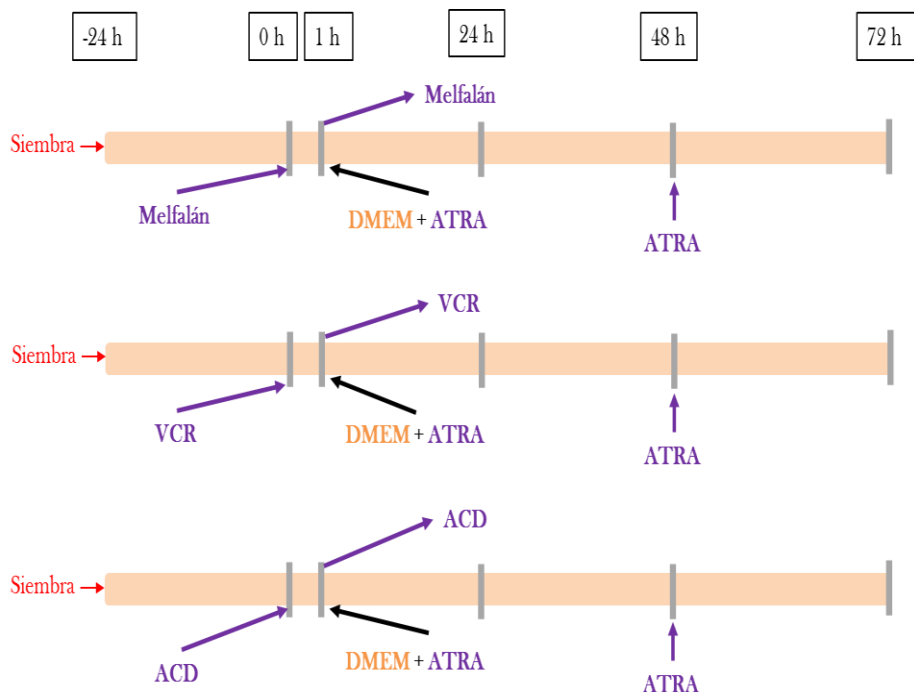


Figura 20. Pauta de tratamiento de las células S4MH con los fármacos antitumorales y el ATRA.

III.2.2.7. Estudio del efecto combinado de los agentes quimioterápicos y el ATRA en presencia de los FCs

En este estudio se valoró la respuesta ejercida por la combinación terapéutica de los agentes antitumorales y el ATRA en presencia de los FC en el cultivo. La adición de los fármacos se realizó a las 24 horas de la siembra celular. Transcurrido el período de exposición a la IC_{50} de cada fármaco, se procedió a su retirada y sustitución por medio de cultivo fresco con FC y ATRA hasta las 72 horas. En aquellos pocillos con tratamiento con ATRA, éste se añadió a $t=0$ horas y se refrescó a $t=48$ horas (Figura 21).

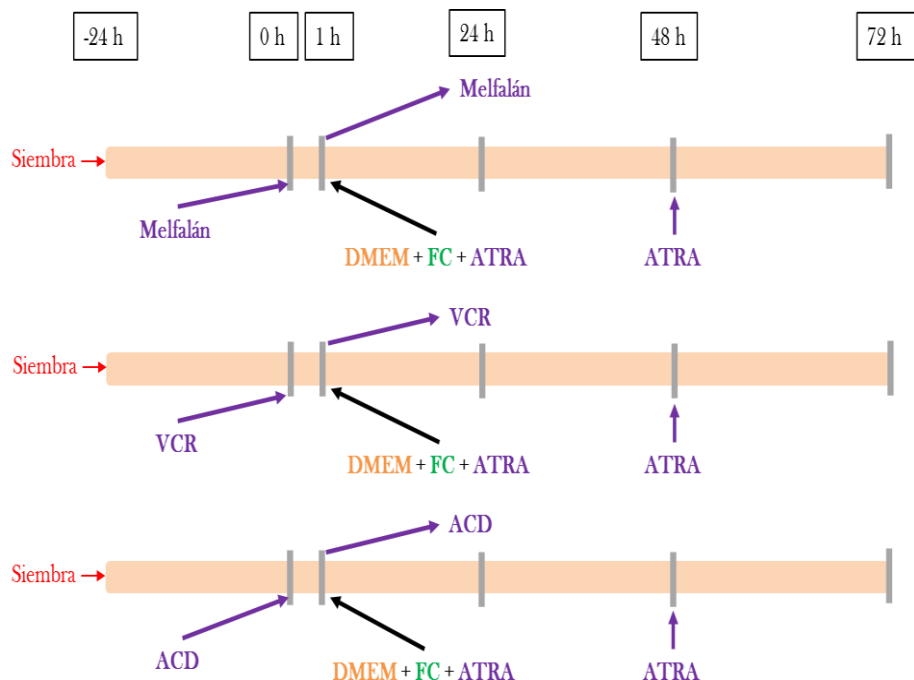


Figura 21. Pauta de tratamiento de las células S4MH con los fármacos antitumorales y el ATRA, en presencia de los FC.

III.2.3. Análisis estadístico

Los ensayos *in vitro* fueron repetidos, al menos, tres veces, y en cada uno de ellos, los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado.

Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el programa informático GraphPad Software (Prism™ 4).

III.2.3.1. Media aritmética y desviación estándar

La media aritmética ($\bar{x}$) es el valor medio ponderado de una serie de datos y se obtiene sumando los valores observados (x_i) y dividiendo entre el número total de observaciones (N),

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

La desviación estándar (D.E.) es un indicador del grado de homogeneidad y refleja la dispersión de los datos estudiados para las distintas variables. Este estadístico se define como la raíz cuadrada de la varianza (S^2).

De esta manera, el valor de la S^2 se define como el promedio de los cuadrados de las desviaciones que las observaciones tienen respecto a su media y se expresa,

$$S^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

por lo que el cálculo de la D.E. se determina mediante la fórmula,

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

III.2.3.2. Análisis de la varianza

El análisis de la varianza (ANOVA) es una prueba estadística en la que la comparación entre grupos se realiza a través de la varianza de la variable numérica y, en cada grupo, de la variable categórica x. El objetivo de la varianza es comprobar si las diferencias entre las medias de distintos grupos son o no significativas.

La cifra estadística obtenida con el ANOVA es la razón F de Snedecor, determinada mediante la siguiente relación:

$$F = \frac{S_{E^2}}{S_{D^2}} \longrightarrow F_{t-1, N-t}$$

donde:

$$S_{E^2} = \frac{x \sum_{i=1}^t n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{t-1}$$

$$y: S_{D^2} = \frac{\sum (\chi_{ij} - \bar{\chi}_i)^2}{N - t}$$

Así, para un nivel de significación α , si $F > F_{t-1, N-t}$, las medias de los grupos no son iguales, indicando, por lo tanto, que existen diferencias significativas entre los niveles.

Los resultados de un experimento requieren un tratamiento estadístico que permita orientar acerca de si la hipótesis de investigación debe ser rechazada o no, para lo cual se deberá establecer convencionalmente un determinado nivel de significación que permita diferenciar resultados estadísticamente significativos de aquellos que no lo son.

El nivel de confianza utilizado en los experimentos es del 95%, es decir, las valoraciones son estadísticamente significativas cuando la probabilidad (p) debida al azar es menor que 0.05.

IV. RESULTADOS

IV.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA DINÁMICA PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS S4MH

IV.1.1. Efecto del factor de crecimiento hepatocitario HGF

En primer lugar, se analizó el efecto de distintas concentraciones del factor sobre la actividad proliferativa *in vitro*. Las concentraciones iguales o inferiores a 15 ng/ml, produjeron un incremento significativo en la proliferación de las células S4MH.

De las concentraciones que incrementaron la proliferación respecto al control (5, 7.5, 10 y 15 ng/ml), la que mayor efecto produjo fue 10 ng/ml, que aumentó la proliferación 1.31 veces respecto al control a las 24 h, 1.22 veces a las 48 h y 1.24 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 22). Las dosis superiores redujeron significativamente la proliferación celular ($p < 0.05$).

La exposición del cultivo a 10 ng/ml de HGF hizo que la ratio CP experimentara un incremento inicial de 1.31 veces respecto al control las primeras 24 h ($p < 0.001$) para mantener el resto de tiempos la misma cinética proliferativa del control.

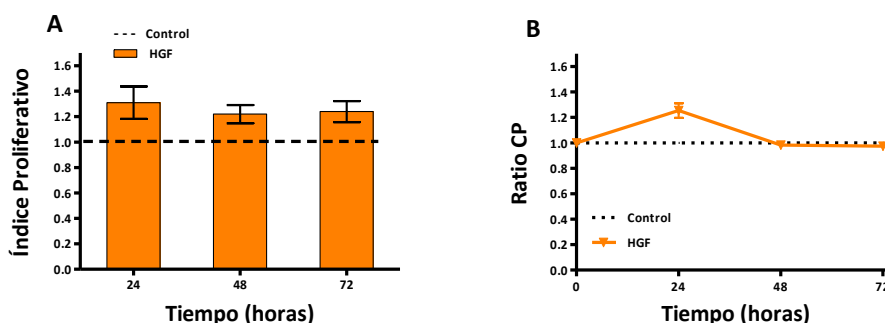


Figura 22. Efecto del HGF (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.1.2. Efecto del factor de crecimiento similar a la insulina IGF-2

Al igual que con el HGF, se analizó el efecto de distintas concentraciones del factor IGF-2 sobre la actividad proliferativa *in vitro*. Únicamente la concentración de 10 ng/ml produjo un incremento significativo en la proliferación de las células S4MH,

siendo ésta 1.31 veces superior al control a las 24 h y 1.30 veces a las 48 h y se redujo a 1.22 veces a las 72 h ($p<0.001$; Figura 23).

Las dosis de 5 y 25 ng/ml mantuvieron valores proliferativos idénticos al control, en cambio, dosis de 50 y 100 ng/ml redujeron significativamente la proliferación del cultivo ($p<0.05$).

La ratio CP se incrementó significativamente 1.31 veces en las primeras 24 h ($p<0.05$), para volver a los valores del control a las 48 h ($p>0.001$) y sigue descendiendo a las 72 h ($p>0.05$).

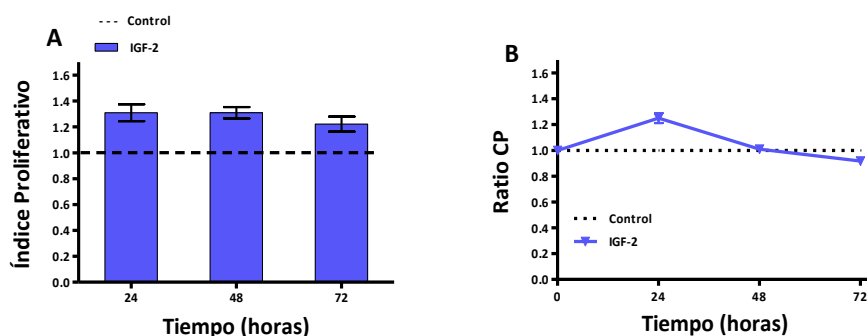


Figura 23. Efecto del IGF-2 (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.1.3. Efecto del factor de crecimiento plaquetario PDGF-BB

Se analizó el efecto de distintas concentraciones del factor sobre la actividad proliferativa *in vitro*. Únicamente la concentración de 10 ng/ml produjo un incremento significativo en la proliferación de las células S4MH, aumentando la proliferación 1.32 veces respecto al control a las 24 h, para mantenerse en 1.22 veces a las 48 h y 1.20 veces a las 72 h ($p<0.001$; Figura 24).

Del resto de dosis estudiadas, las dosis de 5 y 20 ng/ml no modificaron significativamente la proliferación, mientras que las dosis mayores, de 30 y 40 ng/ml, redujeron dicho índice proliferativo ($p<0.05$).

El PDGF-BB mostró un incremento significativo en la ratio CP del cultivo, con un valor 1.32 veces superior al control a las 24 h ($p<0.001$). En el resto de tiempos de medida su perfil cinético y el del control se mantienen parejos.

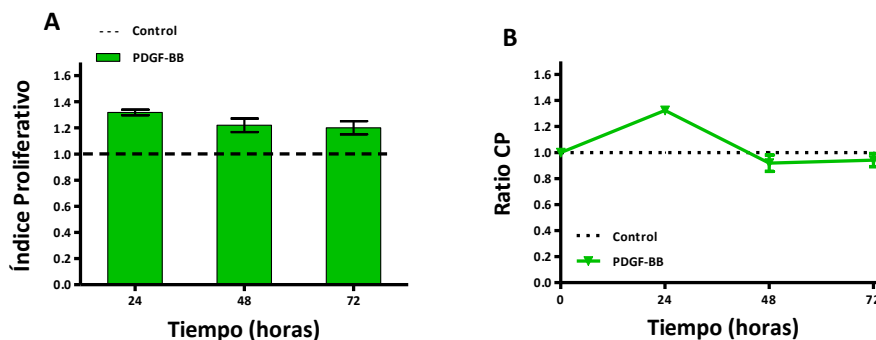


Figura 24. Efecto del PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.1.4. Efecto del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF

Se analizó el efecto de distintas concentraciones del factor sobre la actividad proliferativa *in vitro*. Concentraciones iguales o menores de 10 ng/ml produjeron un incremento significativo en la proliferación de las células S4MH.

Únicamente las dosis de 5 y 10 ng/ml incrementaron la proliferación, siendo la dosis de 10 ng/ml la que indujo un mayor incremento de la misma con un valor de 1.41 veces respecto al control a las 24 h, 1.30 veces a las 48 h y 1.22 veces a las 72 h ($p<0.001$; Figura 25). Dosis de 30 y 40 ng/ml redujeron la proliferación del cultivo significativamente ($p<0.05$).

La ratio CP, que se ve incrementada 1.41 veces en las primeras 24 h de exposición al fármaco ($p<0.001$), regresa a valores similares al control en el resto de tiempos de estudio.

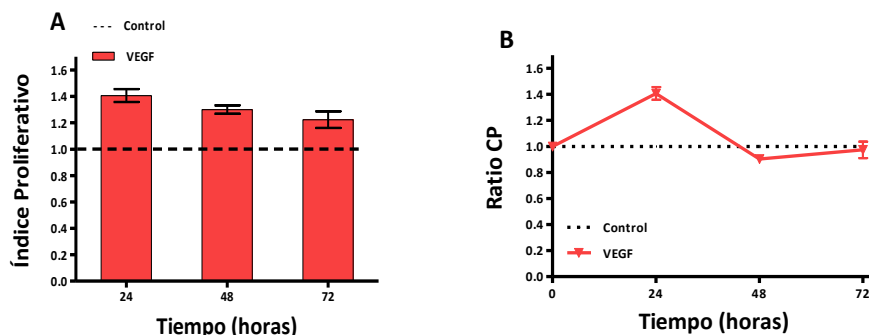


Figura 25. Efecto del VEGF (10 ng/ml) sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.1.5. Efecto del factor de crecimiento fibroblástico básico FGF_b

En condiciones estándar del cultivo (10% SBF), la exposición de las células a FGF_b no provocó modificaciones significativas en la proliferación respecto al control. Sin embargo, al reducir el porcentaje de SBF presente en el cultivo al 7.5%, el FGF_b indujo un incremento significativo de la proliferación.

En los cultivos con 7.5% de SBF, la exposición a 10 ng/ml de FGF_b incrementó la proliferación respecto al control 1.30, 1.21 y 1.51 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 26).

La ratio CP muestra un incremento respecto al control de 1.30 veces a las 24 h y 1.23 veces a las 72 h ($p < 0.001$), siendo similar a los valores del control a las 48 h.

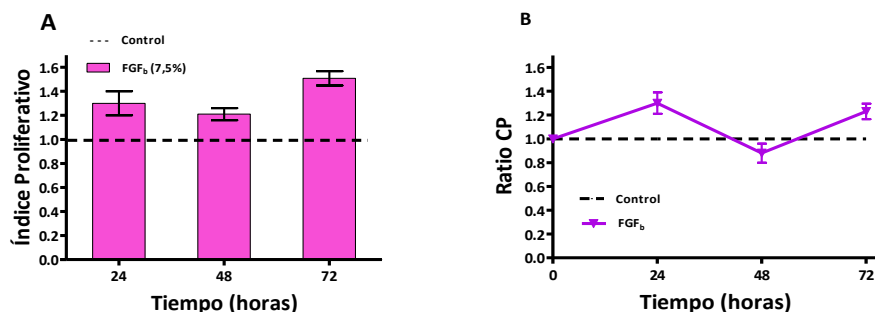


Figura 26. Efecto del FGF_b (10 ng/ml) a dosis de SBF del 7.5% sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.1.6. Efecto del factor de crecimiento epidérmico EGF

En condiciones estándar del cultivo (10% SBF), la exposición a EGF no provocó modificaciones significativas en la proliferación respecto al control. Sin embargo, al reducir el porcentaje de SBF presente en el cultivo al 7.5%, el EGF indujo un incremento significativo de la proliferación.

En los cultivos con 7.5% de SBF, la exposición a 25 ng/ml de EGF incrementó la proliferación respecto al control 1.30, 1.22 y 1.33 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.01$; Figura 27). La ratio CP se ve incrementada 1.30 veces en las primeras 24 h de exposición al fármaco ($p < 0.001$) y tiende a igualarse al control de la experiencia a las 48 h y 72 h.

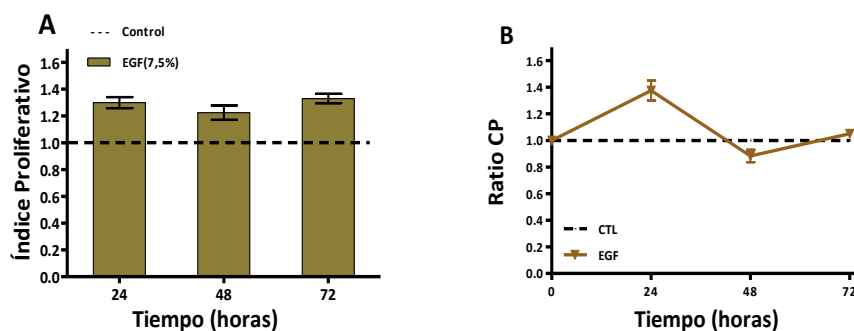


Figura 27. Efecto del EGF (25 ng/ml) a dosis de SBF del 7.5% sobre de las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.1.7. Comparación del efecto de los factores de crecimiento HGF, IGF-2, PDGF-BB, VEGF, EGF y FGF_β sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

Todos los factores de crecimiento inducen la proliferación de las células S4MH, dando lugar a un incremento similar a las 24 h (1.30-1.41 veces) en relación al control (Figura 28).

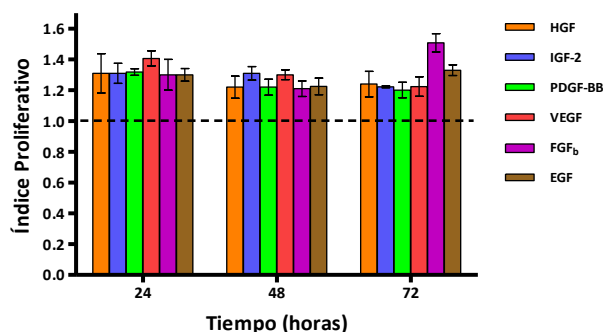


Figura 28. Efecto de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.

De todos los FCs, el VEGF es el que ejerce un mayor efecto inductor a dicho tiempo (1.41 veces; Figura 29).

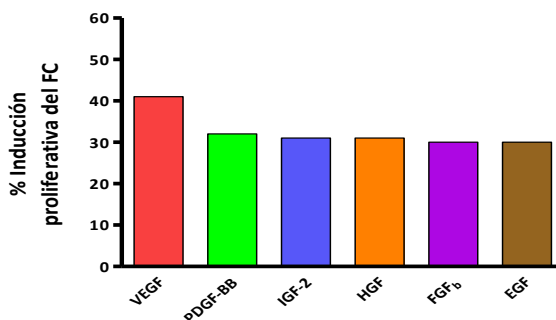


Figura 29. Inducción proliferativa ejercida por los factores de crecimiento sobre las células S4MH a las 24 h.

Respecto a la cinética de proliferación, la Figura 30 muestra cómo tras el incremento inicial a las 24 h, la tendencia de todos los FC es a igualar su ratio CP con la del control.

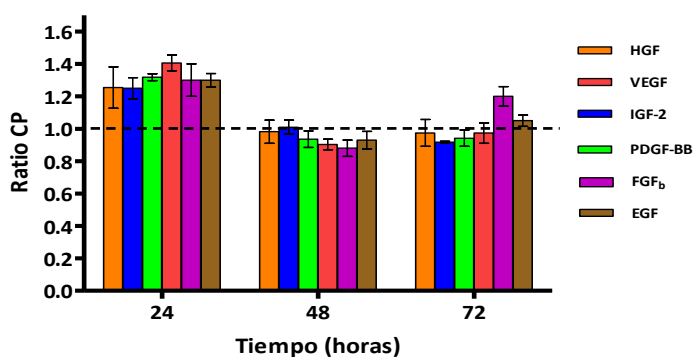


Figura 30. Efecto de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

IV.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO ALL-TRANS RETINOICO (ATRA) SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS S4MH

El tratamiento con ATRA 10^{-6} M redujo significativamente la proliferación de la línea celular S4MH. Dicha reducción fue de 1.40, 1.30 y 1.40 veces respecto al control a las 24 h, 48 h y 72 h ($p < 0.001$; Figura 31).

La ratio CP experimentó un descenso en la velocidad de proliferación de 1.40 veces respecto al control tras las primeras 24 h ($p < 0.001$), para recuperar los valores del control a las 48 y 72 h.

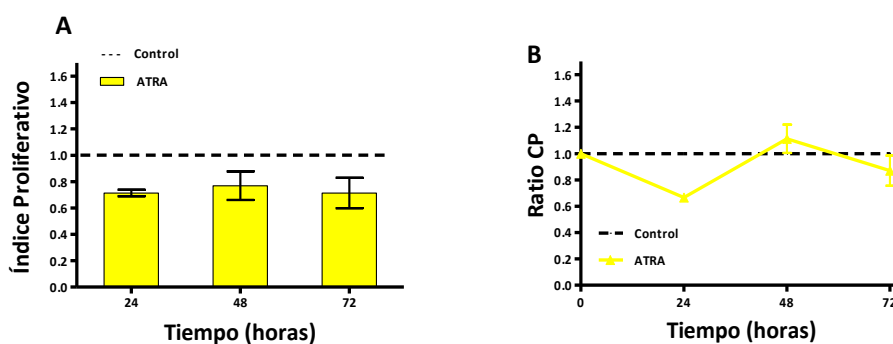


Figura 31. Efecto del ATRA 10^{-6} M sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ATRA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

IV.3.1. Estudio del efecto del ATRA en presencia de HGF

El tratamiento con ATRA en presencia de HGF reduce de forma significativa la proliferación celular, de modo que se mantiene en los valores de proliferación del ATRA en ausencia del factor a las 72 h. Cuando aplicamos ATRA al cultivo en presencia de HGF se reduce el crecimiento 1.26 veces respecto al control a las 24 h, se iguala al control a las 48 h y se vuelve a reducir 1.40 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 32A). Además, no existen diferencias significativas con respecto al tratamiento en solitario con ATRA, excepto a las 48 h (cuando se iguala a la proliferación del control), de modo que este agente reduce el efecto proliferativo llevado a cabo por el HGF 1.70 veces a las 24 h, 1.22 veces a las 48 h y 1.73 veces a las 72 h.

El ATRA en presencia de HGF reduce la ratio CP 1.26 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$; Figura 32B). A las 48 h la tendencia se invierte, y se eleva 1.13 veces por encima de la tasa del control ($p < 0.001$). Por último, a las 72 h se reduce de nuevo 1.25 veces por debajo de la tasa del control.

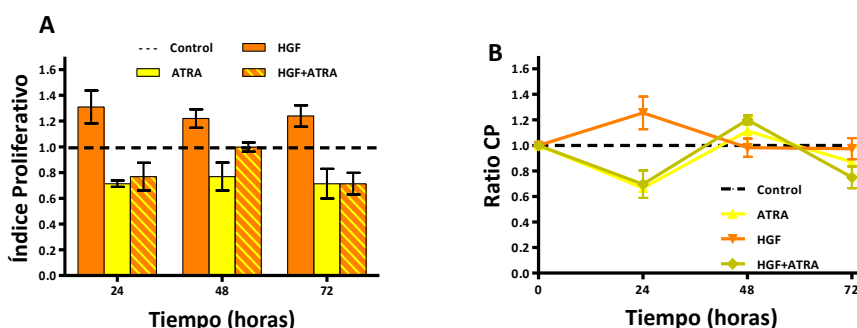


Figura 32. Efecto del ATRA (10^{-6} M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio Cp.

IV.3.2. Estudio del efecto del ATRA en presencia de IGF-2

El tratamiento con ATRA revierte el efecto inductor de la proliferación del IGF-2, de modo que la proliferación tiende a igualarse a los valores del control, excepto

a las 72 h, momento en el que se reduce el crecimiento 1.30 veces respecto al control ($p<0.001$; Figura 33A). Así, esta terapia reduce la inducción proliferativa llevada a cabo por el IGF-2, 1.30 veces a las 24 h y 48 h y 1.58 veces a las 72 h.

El ATRA en presencia de IGF-2 reduce la ratio CP respecto al control 1.26 veces, a las 72 h ($p<0.001$; Figura 33B).

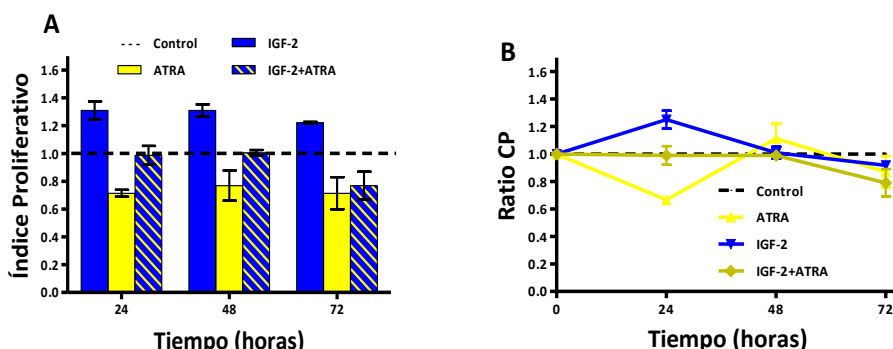


Figura 33. Efecto del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.3.3. Estudio del efecto del ATRA en presencia de PDGF-BB

El tratamiento con ATRA en presencia de PDGF-BB en el medio de cultivo reduce de forma significativa la proliferación celular, de modo que se aproxima a los valores de proliferación del ATRA en ausencia del factor, excepto a las 48 h, cuando su proliferación se iguala a la del control. Cuando aplicamos ATRA al cultivo en presencia de PDGF-BB se reduce el crecimiento respecto al control 1.20 y 1.30 veces a las 24 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 34A). De este modo, este agente reduce 1.57 veces a las 24 h, 1.22 veces a las 48 h y 1.56 veces a las 72 h, la inducción proliferativa llevada a cabo por el PDGF-BB.

El ATRA en presencia del PDGF-BB reduce la ratio CP 1.38 veces respecto al control en las primeras 24 h, a las 48 h se hace 1.21 veces superior al control, para reducirse de nuevo 1.29 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 34B).

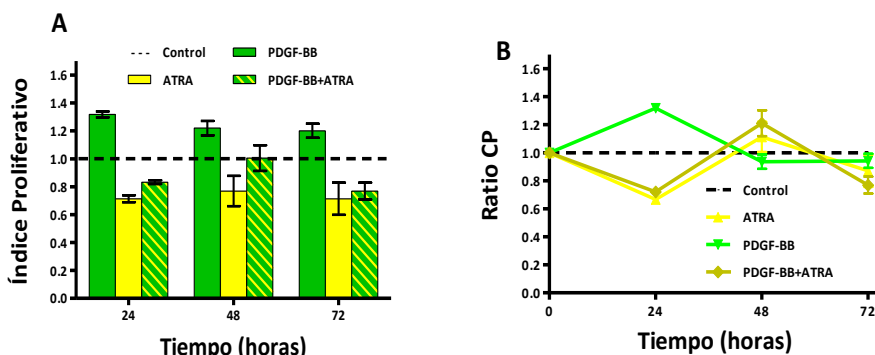


Figura 34. Efecto del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.3.4. Estudio del efecto del ATRA en presencia de VEGF

El tratamiento con ATRA en presencia de VEGF reduce de forma significativa la proliferación celular, de modo que se aproxima a los valores de proliferación del ATRA en ausencia del factor. Cuando aplicamos ATRA al cultivo en presencia de VEGF se reduce el crecimiento respecto al control 1.30, 1.10 ($p > 0.05$) y 1.40 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 35A). Así, no existen diferencias significativas respecto al tratamiento con ATRA en solitario, de modo que este agente reduce el estímulo proliferativo llevado a cabo por el VEGF 1.82 veces a las 24 h, 1.43 veces a las 48 h y 1.71 veces a las 72 h.

El ATRA en presencia del VEGF reduce la ratio CP 1.29 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$). A las 48 h es 1.19 veces superior y a las 72 h 1.17 veces menor que el control, aunque no existen diferencias significativas respecto a éste ($p > 0.05$; Figura 35B).

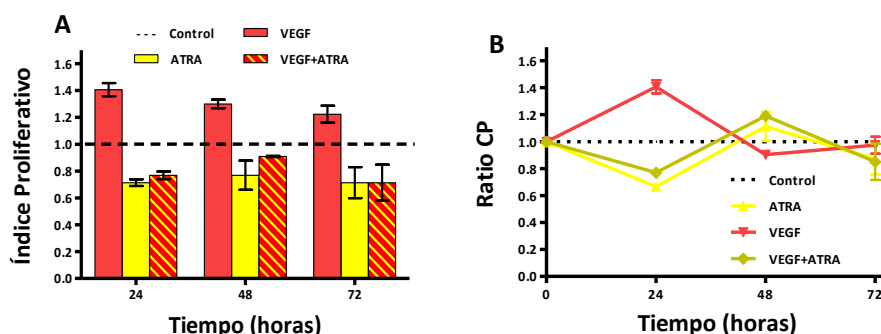


Figura 35. Efecto del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.3.5. Estudio del efecto del ATRA en presencia de FGF_b

En condiciones de cultivo con SBF al 7.5%, el tratamiento con ATRA en presencia de FGF_b reduce de forma significativa la proliferación celular, de modo que se aproxima a los valores de proliferación del control. Cuando aplicamos ATRA al cultivo en presencia de FGF_b se reduce el crecimiento 1.20 veces a las 24 h respecto al control ($p < 0.01$; Figura 36A). Para los demás tiempos estudiados, no existen diferencias significativas en la proliferación respecto al control ($p > 0.05$). De este modo, este agente reduce la inducción proliferativa llevada a cabo por el FGF_b 1.56 veces a las 24 h, 1.21 veces a las 48 h y 1.52 veces a las 72 h.

El ATRA en presencia del FGF_b reduce significativamente la ratio CP respecto a la del control 1.16 veces en las primeras 24 h ($p < 0.001$). En el resto de tiempos del estudio, la cinética tiende a igualarse a los valores cinéticos del control ($p > 0.05$; Figura 36B).

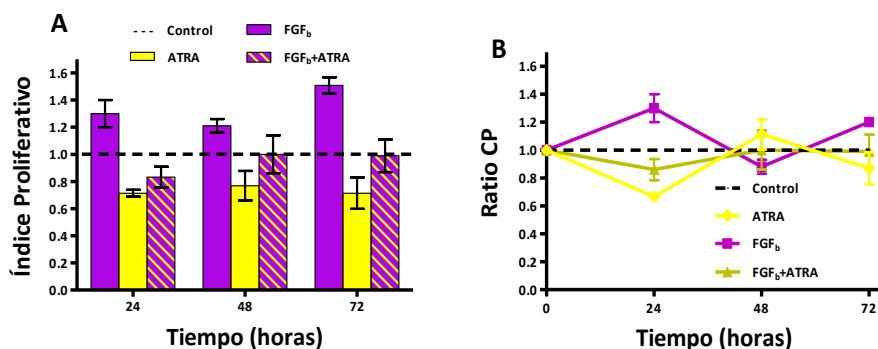


Figura 36. Efecto del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP, al reducir la concentración de SBF al 7.5%.

IV.3.6. Estudio del efecto del ATRA en presencia de EGF

En condiciones de cultivo con SBF al 7.5%, el tratamiento con ATRA en presencia de EGF reduce de forma significativa la proliferación celular a los valores del control. Así, este agente reduce la inducción proliferativa llevada a cabo por el EGF 1.33 veces a las 24 h, 1.18 veces a las 48 h y 1.27 veces a las 72 h (Figura 37A).

El ATRA en presencia del EGF mantiene durante todos los tiempos del estudio una ratio CP similar a la del control ($p > 0.05$; Figura 37B).

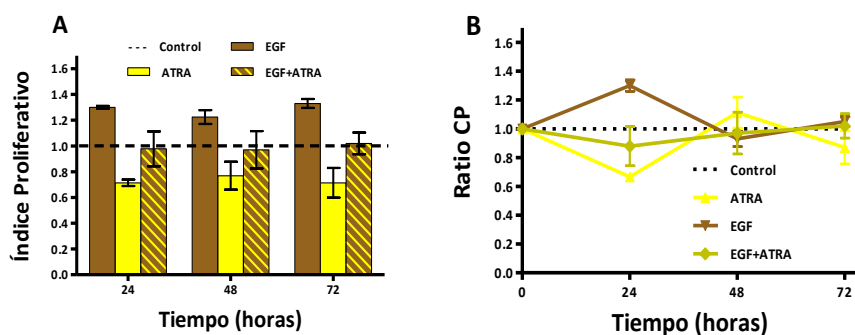


Figura 37. Efecto del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP, al reducir la concentración de SBF al 7.5%.

IV.3.7. Comparación del efecto del ATRA en presencia de los factores de crecimiento EGF, FGF_b, HGF, IGF-2, PDGF-BB y VEGF sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

El ATRA revierte el efecto inductor de la proliferación ejercido por los factores de crecimiento (Figura 38), dando lugar a una reducción máxima de la proliferación a las 24 h, con valores comprendidos entre 1.30 y 1.82 veces respecto a cada factor en solitario.

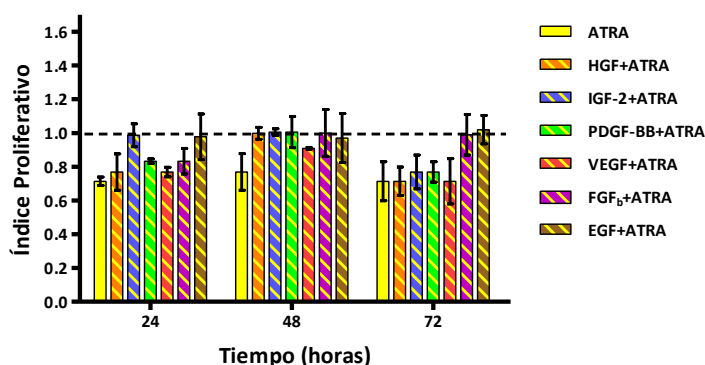


Figura 38. Comparación del efecto de la adición del ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.

Los factores de crecimiento más afectados por el tratamiento con ATRA fueron el VEGF, el HGF, el PDGF-BB y el FGF_b, que ven reducida su acción un 45.33%, un 41.29%, un 36.79% y un 35.92%, respectivamente. (Figura 39).

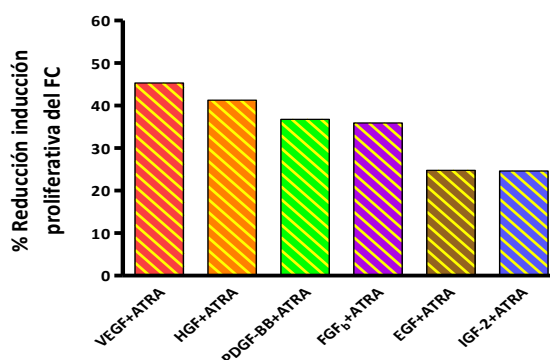


Figura 39. Efecto reductor de la proliferación del ATRA (10^{-6} M) sobre la actividad de los factores de crecimiento a las 24 h.

La figura 40 ilustra cómo la cinética proliferativa resultante del tratamiento con ATRA en presencia de los factores de crecimiento, tiende a ajustarse al modelo de ratio CP producido por el ATRA en ausencia de dichos factores de crecimiento.

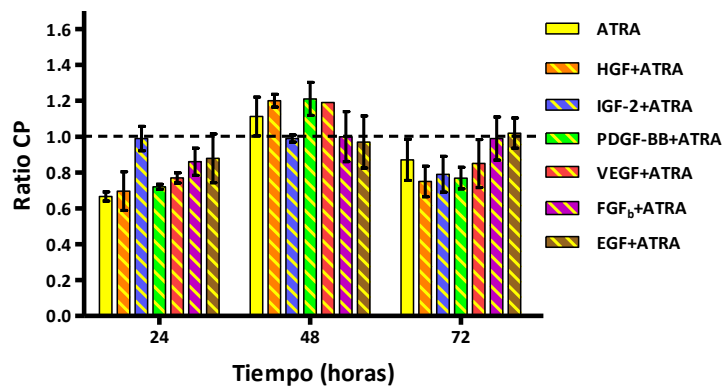


Figura 40. Comparación del efecto de la adición del ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

IV.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL MELFALÁN, LA VCR Y LA ACD SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS S4MH

IV.4.1. Estudio del efecto del melfalán

La exposición del cultivo a melfalán produjo un descenso significativo en la proliferación de las células S4MH. En el estudio se ensayaron diferentes concentraciones del fármaco con una hora de exposición para conocer la IC₅₀.

Las dosis ensayadas fueron 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M. Con las dosis utilizadas se produjo una reducción significativa en la proliferación de forma dosis-dependiente. La IC₅₀ a las 48h resultó ser 2.5 μ M, que redujo significativamente la proliferación 2.20, 2.0 y 1.40 veces en comparación al control a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 41A).

El melfalán presenta una actividad máxima a las 24 h, con una ratio CP 2.20 veces menor que la del control $p < 0.001$; no obstante, cuando el fármaco es retirado del medio de cultivo, se aprecia una recuperación en la CP, aumentando significativamente por encima de la del control, 1.18 y 1.33 veces a las 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 41B).

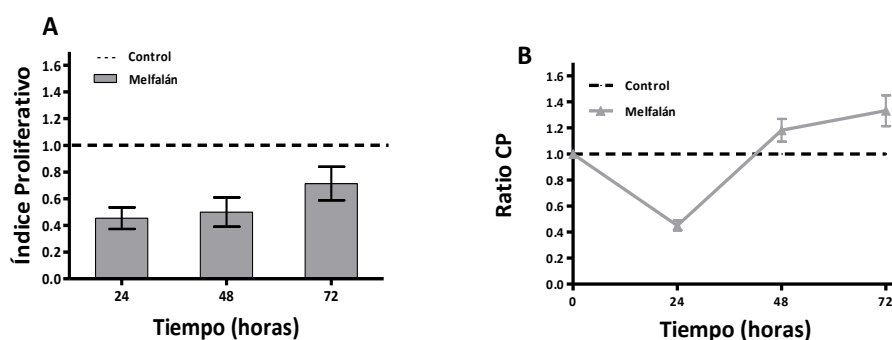


Figura 41. Efecto del melfalán (2.5 μ M, 1 hora de exposición) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.4.2. Estudio del efecto de la VCR

La VCR dio lugar a un descenso significativo en la proliferación de las células S4MH. En el estudio se ensayaron diferentes concentraciones del fármaco con una hora de exposición para conocer la IC_{50} (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 ng/ml). Se produjo una reducción significativa en la proliferación de forma dosis-dependiente. La IC_{50} a las 48h resultó ser 5 ng/ml, que redujo significativamente la proliferación 2.20, 2.0 y 1.60 veces en comparación al control a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 42A).

Tras una reducción máxima de la ratio CP a las 24 h (2.20 veces inferior al control; $p < 0.001$), y una vez es retirado el fármaco del medio de cultivo, se aprecia como la cinética proliferativa de se iguala a la tasa del control ($p > 0.05$; Figura 42B).

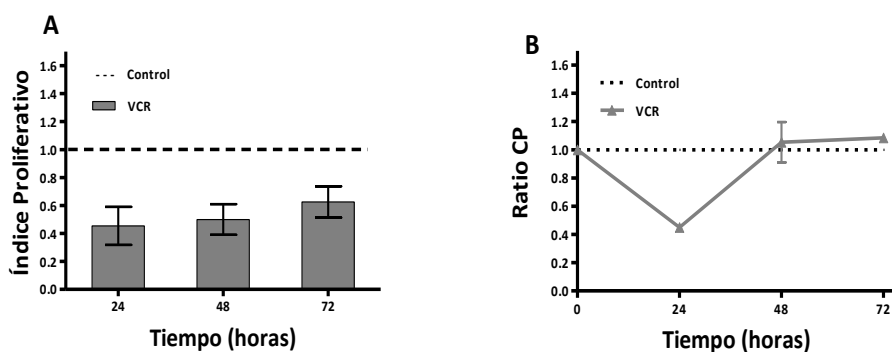


Figura 42. Efecto de la VCR (5 ng/ml 1 hora de exposición) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.4.3. Estudio del efecto de la ACD

La ACD tuvo ocasionó un descenso significativo en la proliferación de las células S4MH. En el estudio se utilizaron diferentes concentraciones del fármaco con una hora de exposición para conocer la IC_{50} (1, 10, 15, 25 y 50 ng/ml). Todas las dosis utilizadas produjeron una reducción significativa en la proliferación de forma dosis-dependiente. La IC_{50} resultó ser 15 ng/ml, que redujo significativamente la proliferación 2.60, 2.0 y 1.80 veces en comparación al control a las 24 h, 48 h y 72 h ($p < 0.001$; Figura 43A).

La reducción máxima de la ratio CP inducida por la ACD se produjo a las 24 h (2.60 veces menor que la del control; $p<0.001$). Cuando el fármaco es retirado del medio de cultivo, se aprecia una recuperación en la CP, aumentando 1.32 veces por encima de la del control a las 48 h ($p<0.001$) e igualándose a ésta a las 72 h (Figura 43B).

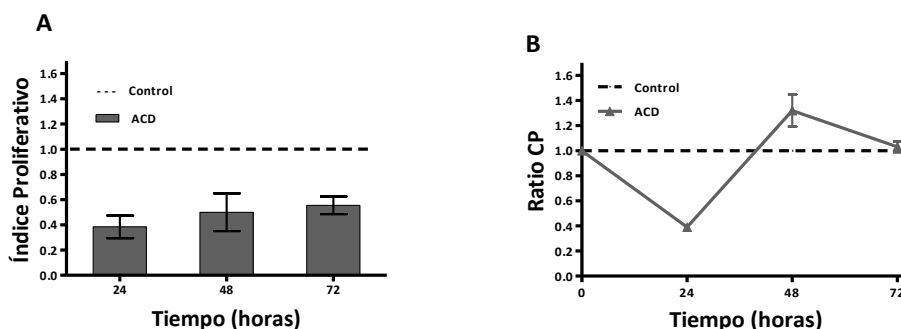


Figura 43. Efecto de la ACD (15 ng/ml 1 hora de exposición) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.4.4. Comparación del efecto de la ACD, la VCR y el Melfalán sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

A partir de los resultados obtenidos, se calculó la IC_{50} , que fue de 2.5 μ M, es decir, $8.19 \cdot 10^{-3}$ ng/ml para el melfalán, 5 ng/ml para la VCR y 15 ng/ml para la ACD. A las 72 h, la reducción del índice proliferativo respecto al control es de 1.40 veces (28.60%) para el melfalán, 1.60 veces (37.50%) para la VCR y 1.80 veces (44.50%) para la ACD (Figura 44A).

Tras la retirada del fármaco del medio de cultivo, en los 3 casos se produce un efecto rebote en la cinética proliferativa, si bien sólo en el caso del melfalán dicha cinética permanece incrementada con respecto a la del control hasta las 72 h (Figura 44B).

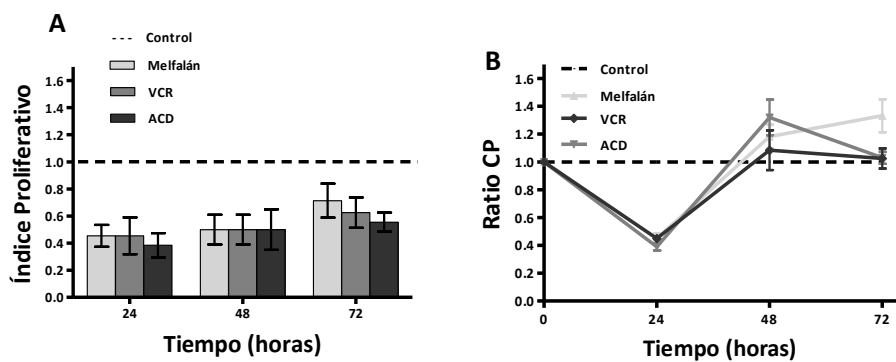


Figura 44. Comparación del efecto del melfalán (2.5 μ M), la VCR (5 ng/ml) y la ACD (15 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL MELFALÁN EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

IV.5.1. Estudio del efecto del melfalán en presencia de HGF

El efecto del tratamiento con melfalán se ve reducido de forma significativa en presencia de HGF, de modo que se aproxima a los valores de proliferación del control.

El tratamiento con melfalán en presencia de HGF en el medio de cultivo reduce el crecimiento 1.87 veces a las 24 h ($p < 0.001$), 1.20 veces a las 48 h ($p < 0.001$) y 1.10 veces a las 72 h respecto al control ($p > 0.05$; Figura 45A). De este modo, dicha proliferación celular fue 1.29, 1.66 y 1.27 veces mayor a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$), que la correspondiente al tratamiento con melfalán en ausencia del factor.

El melfalán en presencia de HGF presenta una ratio CP 1.87 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$), 1.28 veces mayor a las 48 h ($p < 0.001$) y tiende a igualarse a la del control a las 72 h ($p > 0.05$; Figura 45B).

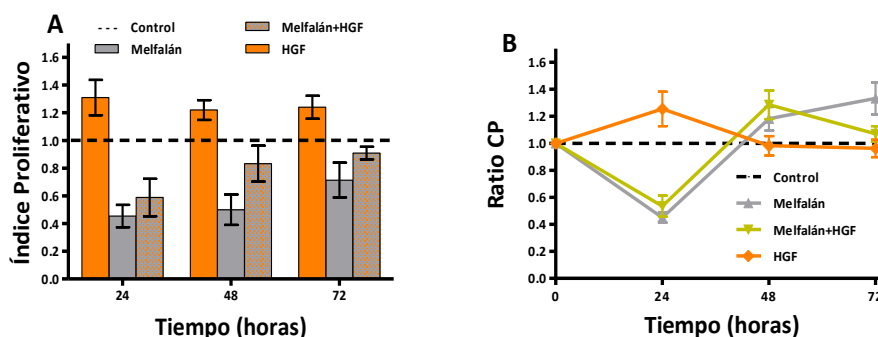


Figura 45. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5.2. Estudio del efecto del melfalán en presencia de IGF-2

La presencia de IGF-2 reduce el efecto antiproliferativo del melfalán, aunque en ningún caso de manera significativa.

Así, el tratamiento con melfalán en presencia de IGF-2 reduce el crecimiento celular 1.8 veces a las 24 h, 1.50 veces a las 48 h y 1.30 veces a las 72 h, respecto al control ($p < 0.001$; Figura 46A), no existiendo diferencias significativas con respecto a la curva proliferativa del tratamiento con melfalán en ausencia del factor.

El melfalán en presencia de IGF-2 presenta una ratio CP 1.8 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$), 1.26 veces mayor a las 48 h ($p < 0.001$) y se iguala al control a las 72 h ($p > 0.05$; Figura 46B).

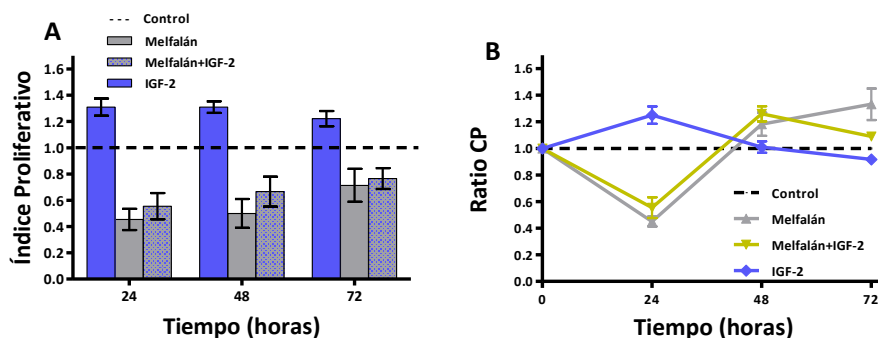


Figura 46. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5.3. Estudio del efecto del melfalán en presencia de PDGF-BB

La presencia de PDGF-BB reduce el efecto del melfalán de forma significativa las primeras 48 h para recuperar los valores de proliferación del melfalán en ausencia del factor a las 72 h.

Cuando aplicamos melfalán al cultivo en presencia de PDGF-BB se reduce la proliferación respecto al control 1.60, 1.40 y 1.30 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 47A). Así, con respecto al tratamiento con melfalán en ausencia del factor, la proliferación celular fue 1.37 veces mayor a las 24 h, 1.43 veces mayor a las 48 h y se iguala a dicho tratamiento a las 72 h ($p > 0.05$).

El melfalán en presencia de PDGF-BB presenta una ratio CP 1.60 veces menor al control las primeras 24 h ($p<0.001$), para tender a los valores cinéticos del control a partir de las 48 h ($p>0.05$; Figura 47B).

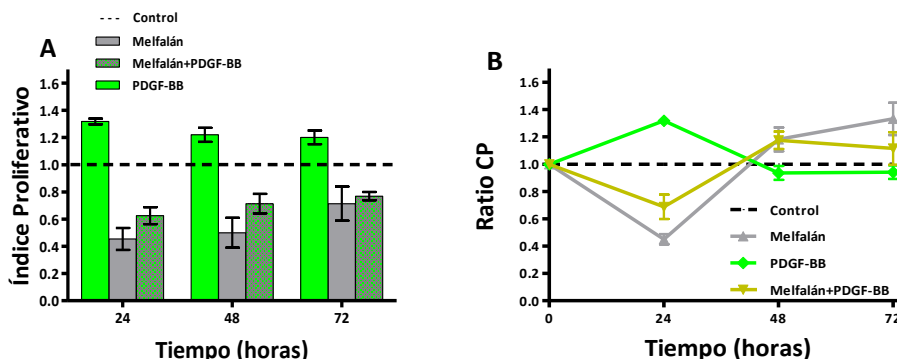


Figura 47. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5.4. Estudio del efecto del melfalán en presencia de VEGF

La presencia de VEGF en el medio de cultivo reduce significativamente el efecto antiproliferativo del melfalán las primeras 48 h para igualarse al melfalán en ausencia del factor a las 72 h.

Cuando aplicamos melfalán en presencia de VEGF se reduce el crecimiento 1.60 veces a las 24 h y 1.40 veces a las 48 h y 72 h respecto al control ($p<0.001$; Figura 48A). Así, con respecto al tratamiento con melfalán en ausencia del factor, la proliferación celular fue mayor 1.37 veces a las 24 h ($p<0.01$), 1.43 veces mayor a las 48 h ($p<0.001$) y se iguala al melfalán en ausencia del factor a las 72 h.

El melfalán en presencia de VEGF presenta una ratio CP 1.60 veces menor al control las primeras 24 h, 1.17 veces mayor a las 48 h ($p<0.001$), y tiende a igualarse a la tasa proliferativa del control a las 72 h ($p>0.05$; Figura 48B).

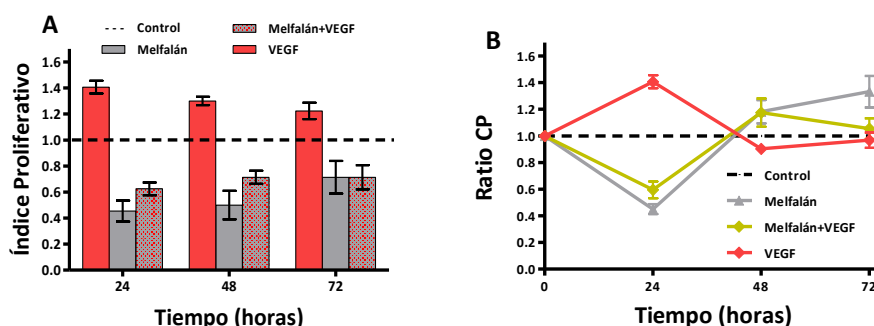


Figura 48. Efecto del melfalán (2.5 μ M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5.5. Estudio del efecto del melfalán en presencia de FGF_b

La presencia de FGF_b en el medio de cultivo no altera significativamente el efecto del melfalán en solitario.

El tratamiento con melfalán en presencia de FGF_b reduce el crecimiento respecto al control 1.90, 1.70 y 1.40 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 49A), de modo que no se altera significativamente la eficacia del tratamiento con melfalán en presencia de dicho factor. El único descenso en la eficacia del fármaco se produce a las 48h en un 14.96%.

El melfalán en presencia de FGF_b presenta una ratio CP 1.90 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$) y 1.29 veces mayor a las 48 h ($p < 0.001$) y 1.10 veces mayor a las 72 h ($p > 0.05$; Figura 49B).

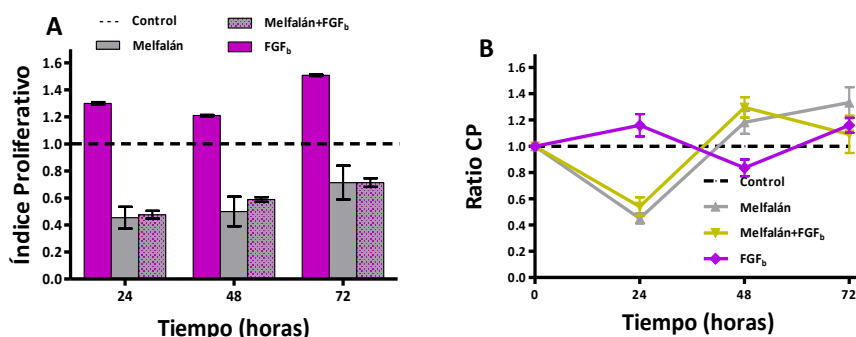


Figura 49. Efecto del melfalán (2.5μM) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5.6. Estudio del efecto del melfalán en presencia de EGF

La presencia de EGF en el medio de cultivo no altera significativamente el efecto del melfalán.

Cuando aplicamos melfalán al cultivo en presencia de EGF se reduce el crecimiento respecto al control 2.10, 1.70 y 1.30 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 50A). Con respecto al tratamiento con melfalán en ausencia del factor, se observa un aumento no significativo de 1.29 veces en la tasa proliferativa en las primeras 24 h y 1.17 veces a las 48 h, igualándose a las 72 h ($p > 0.05$ en todos los tiempos de medida).

El melfalán en presencia de EGF presenta una ratio CP 2.10 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$), se iguala al control a las 48 h ($p > 0.05$) y es 1.22 veces mayor a las 72 h ($p > 0.05$; Figura 50B).

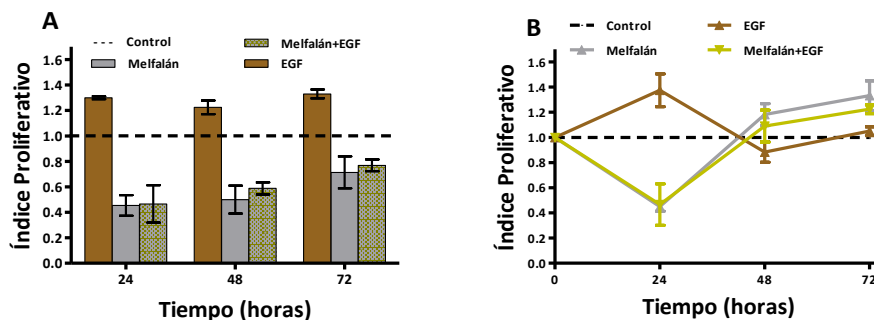


Figura 50. Efecto del melfalán (2.5µM) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.5.7. Comparación del efecto del melfalán en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

El melfalán se ve afectado en su actividad en distinta medida en función del factor de crecimiento presente, tal y como se observa en la Figura 51.

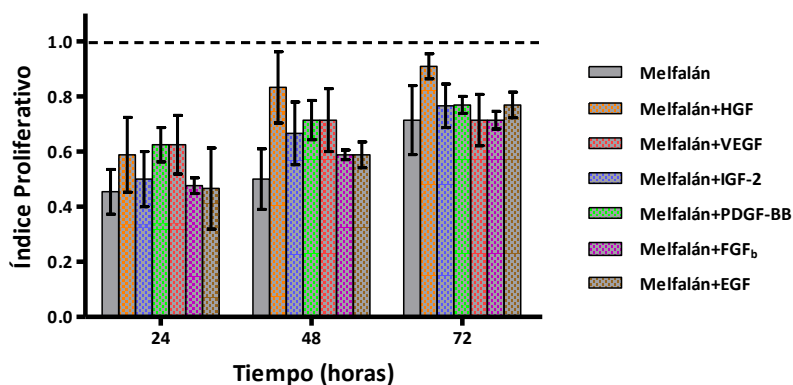


Figura 51. Comparación del efecto del tratamiento con melfalán en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice proliferativo.

Los factores de crecimiento que más afectan el tratamiento con melfalán son el HGF, el VEGF, el PDGF-BB y el IGF-2 que reducen el efecto del tratamiento un 40%, un 30%, un 30%, y un 25%, respectivamente, a las 48h (Figura 52).

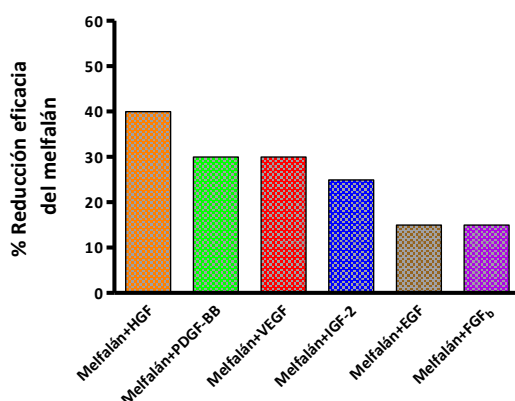


Figura 52. Efecto del melfalán ($2.5\mu\text{M}$) en presencia de los factores de crecimiento sobre la actividad del melfalán a las 48h.

En cuanto a la cinética proliferativa, la Figura 53 ilustra cómo la ratio CP del melfalán en presencia de los factores de crecimiento tiende a asemejarse durante las primeras 48 h al comportamiento cinético del melfalán en solitario, para acabar en las 72 h en valores similares a los del control, exceptuando el caso de que se halle presente el EGF, el cual, incluso a las 72 h presenta una dinámica cinética semejante a la del melfalán en solitario.

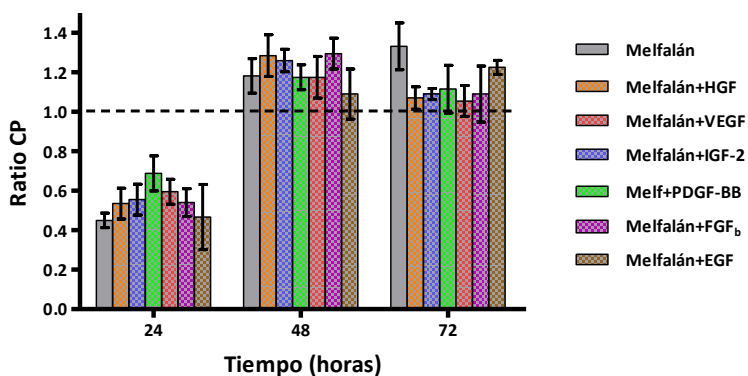


Figura 53. Comparación del efecto del tratamiento con melfalán en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

IV.6. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO MELFALÁN+ATRA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

La adición de ATRA (10^{-6} M) al tratamiento con melfalán ($2.5\mu\text{M}$) redujo significativamente la proliferación de la línea celular S4MH. Dicha reducción fue de 3.10, 3.10 y 2.20 veces con respecto al control a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 54A), lo que supone una mejora de la respuesta antiproliferativa respecto al citostático sin ningún otro agente en el medio de cultivo del 29.07%, del 35.60% y del 36.41% a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente. En este caso, el FMD se sitúa en valores de 0.92 a las 48 h, lo que nos indica que ambos agentes presentan un efecto aditivo.

La ratio CP experimentó un descenso en la velocidad de proliferación de 3.10 veces respecto al control tras las primeras 24 h ($p<0.001$), para tender a los valores del control a las 48 h y aumentar 1.4 veces respecto al control a las 72 h ($p<0.001$; Figura 54B).

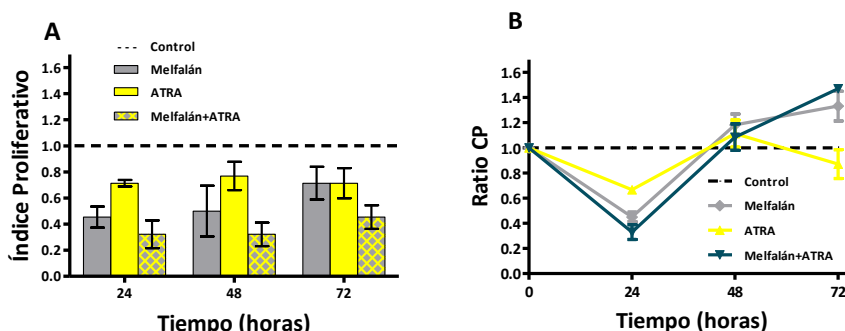


Figura 54. Efecto del melfalán $2.5\mu\text{M}$ en presencia de ATRA 10^{-6}M sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO MELFALÁN+ATRA EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

IV.7.1. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de HGF

Cuando aplicamos ATRA al tratamiento con melfalán en presencia de HGF, se reduce de forma significativa la proliferación celular de modo que se mantiene en los valores de proliferación del melfalán+ATRA en ausencia de dicho factor, excepto a las 24 h en que se ajusta a la proliferación del melfalán en solitario y en ausencia del factor.

Así, el tratamiento melfalán+ATRA en presencia de HGF, reduce el crecimiento respecto al control 2.20, 2.60 y 1.90 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 55A). De este modo, con respecto al tratamiento con melfalán en solitario, dicho tratamiento combinado disminuye 1.29, 2.17 y 1.73 veces la proliferación celular a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$). Este tratamiento combinado da lugar a un FMD de 1.55 a las 48 h, por lo que los agentes presentan un efecto sinérgico.

El tratamiento con melfalán y ATRA en presencia de HGF reduce el ratio CP 2.20 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$; Figura 55B) y 1.2 veces a las 48 h. Se invierte este valor para ser 1.3 veces mayor que el control a las 72 h ($p<0.001$).

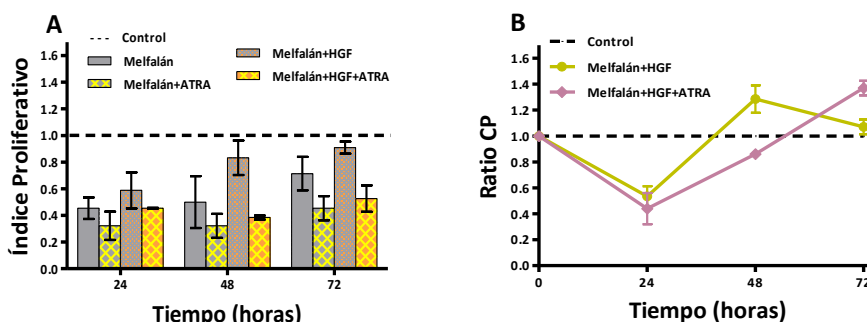


Figura 55. Efecto del melfalán ($2.5\mu\text{M}$) y del ATRA (10^{-6}M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7.2. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de IGF-2

La adición de ATRA al tratamiento con melfalán en presencia de IGF-2, reduce la proliferación de manera significativa, de modo que se ajusta a la proliferación del melfalán en ausencia del factor de crecimiento durante las primeras 48 h, para tender a igualarse a la del melfalán+ATRA a las 72 h.

En presencia de IGF-2, el tratamiento melfalán+ATRA reduce el crecimiento de las células S4MH respecto al control 2.30, 1.70 y 2.0 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 56A). Por otro lado y en presencia de IGF-2, con respecto al tratamiento con melfalán en solitario, la proliferación del cultivo es 1.35, 1.41 y 1.82 veces menor a las 24h, 48h y 72 h ($p<0.001$). Esto da lugar a un FMD a las 48 h de 1.23 (efecto sinérgico).

El melfalán y el ATRA en presencia de IGF-2 reducen la ratio CP 2.30 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$; Figura 56B). Anteriormente, se iguala a la tasa del control ($p<0.01$) y, por último, a las 72 h, se incrementa dicha tasa hasta hacerse 1.32 veces respecto al control ($p<0.001$).

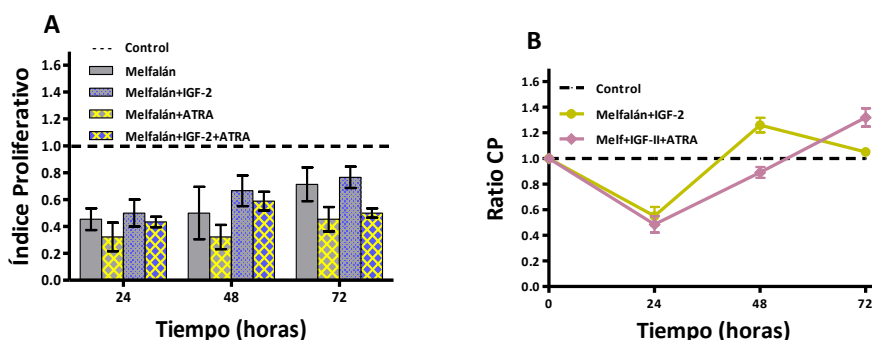


Figura 56. Efecto del melfalán (2.5µM) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7.3. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de PDGF-BB

Al añadir ATRA al tratamiento con melfalán en presencia de PDGF-BB, se reduce la proliferación celular a los valores de proliferación del melfalán en ausencia de dicho factor.

En presencia de PDGF-BB, el tratamiento melfalán+ATRA reduce el crecimiento celular 1.90, 2.0 y 1.51 veces a las 24 h, 48 h y 72 h respecto al control ($p < 0.001$; Figura 57A). Así, en presencia de PDGF-BB, el tratamiento con melfalán+ATRA reduce la proliferación con respecto al melfalán 1.18 veces a las 24 h ($p < 0.05$), 1.43 veces a las 48 h ($p < 0.001$) y 1.07 veces a las 72 h ($p < 0.05$), respectivamente. El FMD obtenido con el tratamiento combinado es de 1.74.

El tratamiento con melfalán y ATRA en presencia de PDGF-BB reduce la ratio CP 1.90 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$; Figura 57B). A las 48 h se iguala al control y a las 72 h se incrementa 1.31 veces sobre la tasa del control.

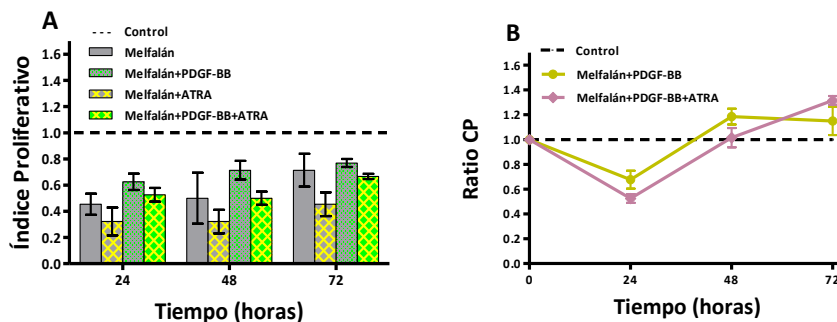


Figura 57. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7.4. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de VEGF

El tratamiento con melfalán+ ATRA en presencia de VEGF, reduce de forma significativa la proliferación celular a los valores de proliferación del melfalán+ATRA en ausencia de dicho factor. Así, esta reducción es de 2.90, 3.0 y 2.0 veces a las 24 h, 48 h y 72 h respecto al control ($p<0.001$; Figura 58A). De este modo, en presencia de VEGF, la administración de melfalán y ATRA reduce la proliferación con respecto al melfalán 1.81, 2.14 y 1.43 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$), siendo el FMD de 1.77.

Por otro lado, el tratamiento combinado en presencia de VEGF reduce 2.90 veces ($p<0.001$) la ratio CP las primeras 24 h, se aproxima al control a las 48 h ($p<0.01$) y se incrementa 1.55 veces a las 72 h ($p<0.001$; Figura 58B).

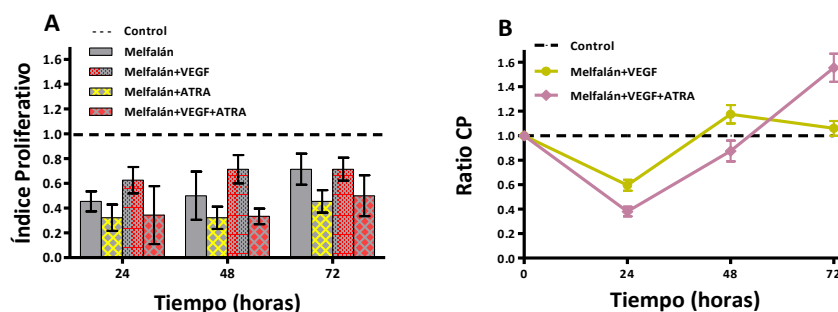


Figura 58. Efecto del melfalán (2.5 μ M) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7.5. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de FGF_b

El tratamiento con melfalán+ ATRA en presencia de FGF_b, reduce de forma significativa la proliferación celular alcanzando los valores de proliferación del melfalán+ATRA en ausencia del factor.

En comparación al control, la combinación melfalán y ATRA en presencia de FGF_b reduce el crecimiento 3.10, 2.60 y 2.0 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 59A). En relación al tratamiento con el citostático en solitario, el tratamiento melfalán+ATRA reduce la proliferación 1.48, 1.53 y 1.43 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente, con un FMD a las 48 h de 1.49.

Asimismo, el tratamiento combinado en presencia de FGF_b presenta la ratio CP con un perfil que se asemeja al del melfalán en solitario en presencia del factor durante las primeras 48 h ($p < 0.01$) para aumentar ligeramente a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 59B).

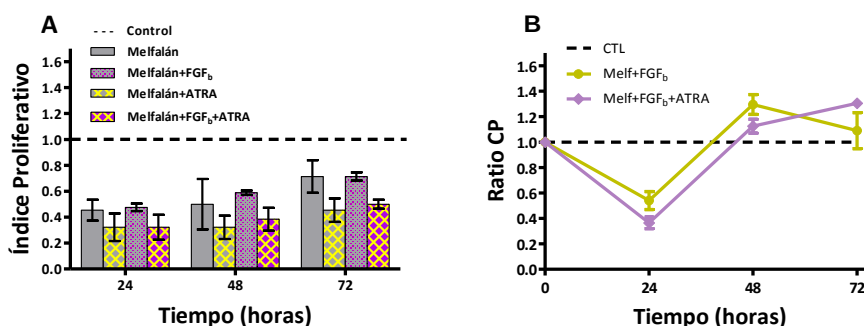


Figura 59. Efecto del melfalán (2.5µM) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de EGF

Cuando aplicamos ATRA al tratamiento con melfalán en presencia de EGF, se reduce de forma significativa la proliferación celular a los valores de proliferación del melfalán+ATRA en ausencia del factor, excepto a las 24 h. Así, esta reducción de la proliferación fue de 1.80, 2.70 y 1.90 veces, en comparación al control, a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 60A). Con respecto al melfalán, el tratamiento melfalán+ATRA reduce la proliferación 1.59 veces a las 48 h ($p < 0.001$) y 1.46 veces a las 72 h ($p < 0.001$). Esto se corresponde con un FMD de 1.53.

El tratamiento combinado en presencia de EGF, en comparación con el control, reduce la ratio CP 1.80, 1.50 veces a las 24 h y 48 h, respectivamente, ($p < 0.001$), siendo 1.4 veces superior a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 60B).

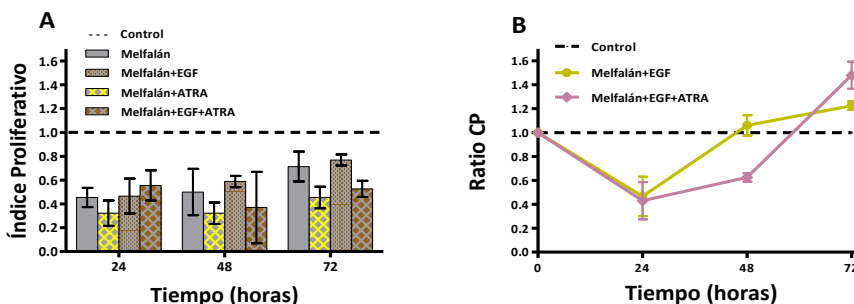


Figura 60. Efecto del melfalán (2.5µM) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.7.7. Comparación del efecto del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

La figura 61 muestra la comparación del efecto antiproliferativo producido por el ATRA asociado al melfalán en presencia de los diferentes factores de crecimiento.

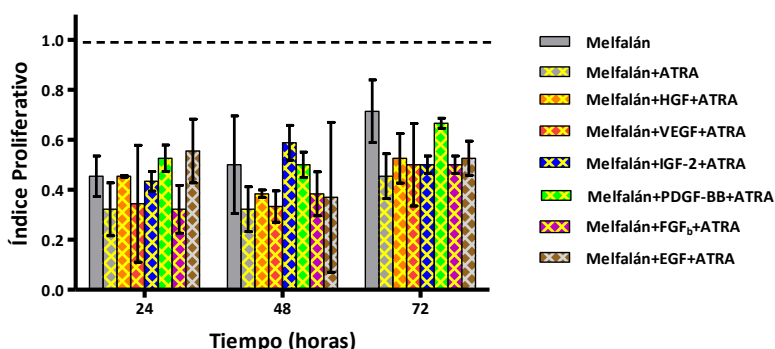


Figura 61. Comparación del efecto del tratamiento combinado melfalán ($2.5\mu\text{M}$)+ATRA (10^{-6}M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.

En presencia de los factores de crecimiento, el tratamiento melfalán+ATRA produce una mayor eficacia antitumoral en comparación a la administración aislada de melfalán, si bien el efecto depende del factor de crecimiento presente. De este modo, la mayor eficacia antiproliferativa de la adición de ATRA al tratamiento con melfalán se obtuvo en presencia del HGF, el VEGF, el EGF, el FGF_b, el PDGF-BB y el IGF-2 (aumento del 53.9%, un 53.36%, un 37.07%, un 34.69%, un 29.97% y un 29.41%, respectivamente, a las 48h; Figura 62).

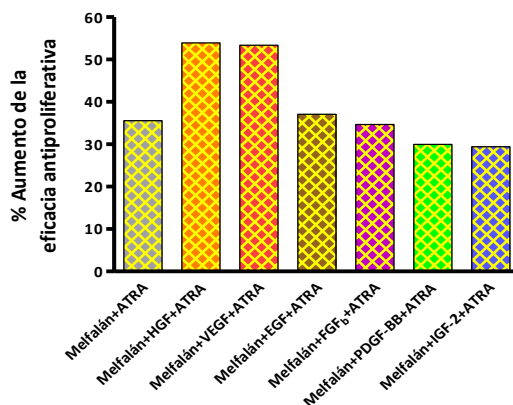


Figura 62. Efecto de la adición de ATRA (10^{-6} M) sobre la eficacia antiproliferativa del tratamiento con melfalán ($2.5\mu\text{M}$) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h.

En todos los casos, se observa un efecto sinérgico del tratamiento melfalán+ATRA cuando están presentes los FCs (Figura 63).

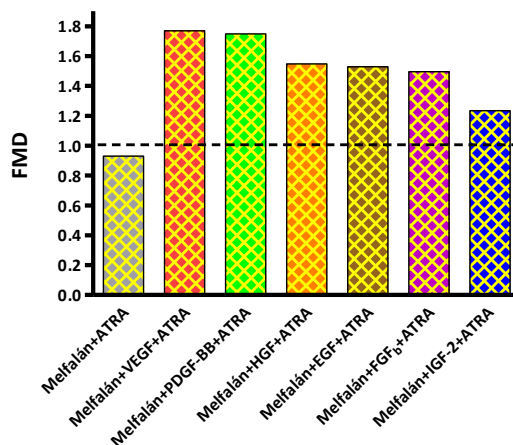


Figura 63. FMD de cada factor de crecimiento sobre el tratamiento combinado melfalán ($2.5\mu\text{M}$)+ATRA (10^{-6} M) a las 48h.

La figura 64 ilustra la comparación de la cinética proliferativa observada tras la aplicación del tratamiento combinado melfalán+ATRA en presencia de los factores de crecimiento.

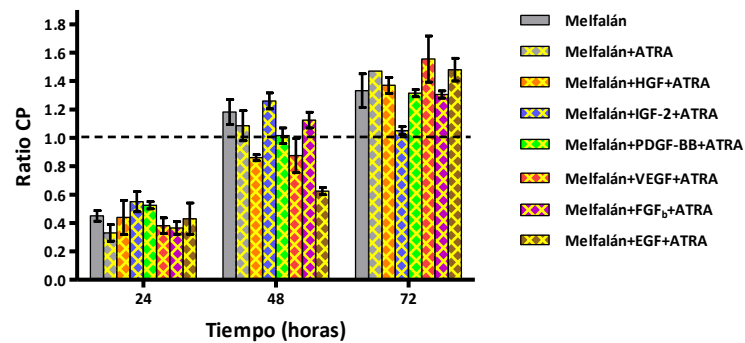


Figura 64. Comparación del efecto del tratamiento combinado melfalán ($2.5\mu\text{M}$)+ATRA (10^{-6}M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

IV.8. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VCR EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

IV.8.1. Estudio del efecto de la VCR en presencia de HGF

El efecto antiproliferativo de la VCR se ve reducido de forma significativa en presencia de HGF, de forma que la proliferación celular recupera los valores del control excepto a las 72 h, donde se aprecia una reducción en la proliferación de 1.20 veces respecto al control ($p < 0.001$; Figura 65A).

De este modo, las células tratadas con VCR en presencia de HGF presentan una proliferación 2.18, 2.06 y 1.33 veces mayor a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$), que la de las células tratadas con VCR en ausencia del factor.

La ratio CP del tratamiento con VCR en presencia de HGF presenta una cinética proliferativa similar a la del control (Figura 65B).

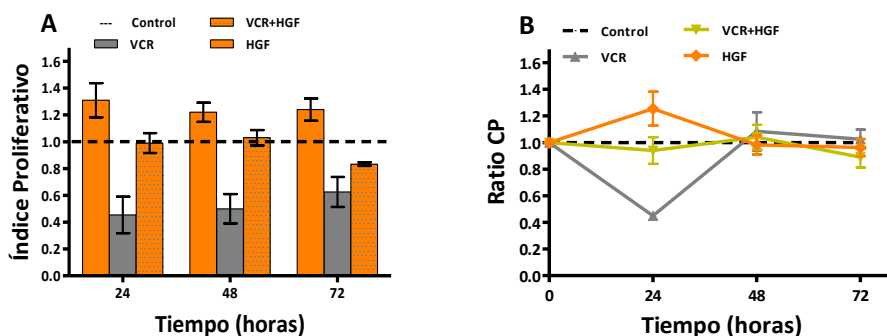


Figura 65. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.8.2. Estudio del efecto de la VCR en presencia de IGF-2

La eficacia antiproliferativa de la VCR en presencia de IGF-2 disminuye significativamente respecto a la producida por dicho fármaco en ausencia del FC.

En comparación con el control, el tratamiento con VCR en presencia de IGF-2 reduce la proliferación 1.30, 1.40 y 1.30 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 66A). Con respecto a las células tratadas con VCR en ausencia del factor, la proliferación celular se incrementó 1.69 veces a las 24 h, 1.43 veces a las 48 h ($p < 0.001$) y 1.23 veces a las 72 h ($p < 0.01$).

La ratio CP del tratamiento con VCR en presencia de IGF-2 fue 1.30 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$), y tiende a igualarse al mismo en el resto de tiempos del estudio ($p > 0.05$; Figura 66B).

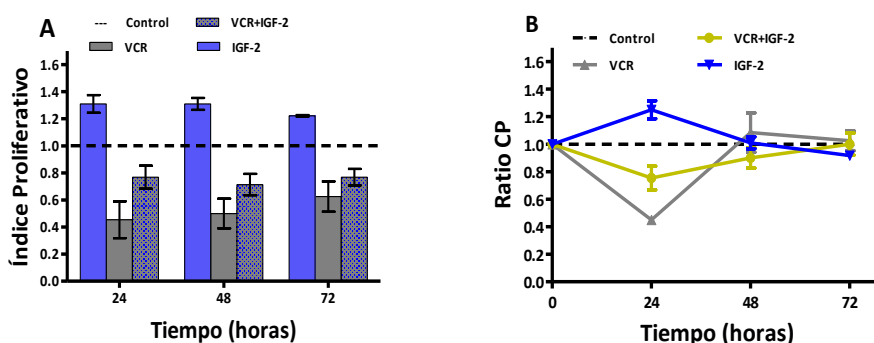


Figura 66. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.8.3. Estudio del efecto de la VCR en presencia de PDGF-BB

La presencia de PDGF-BB en el medio de cultivo no altera de manera significativa el efecto del tratamiento con VCR sobre la proliferación celular. Así, la proliferación celular de las células tratadas con VCR en presencia de PDGF-BB se reduce respecto al control 2.10 veces a las 24 h y 1.60 a las 48 h y 1.50 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 67A). Sólo existen diferencias significativas en el tratamiento con VCR en ausencia o en presencia del factor a las 48 h (incremento de la proliferación de 1.25 veces superior en presencia de PDGF-BB; $p < 0.01$).

La ratio CP del tratamiento con VCR en presencia de PDGF-BB presenta una cinética proliferativa 2.10 veces menor al control las primeras 24 h ($p<0.001$), 1.36 veces mayor a las 48 h ($p<0.001$) y tiende a igualarse a las 72 h ($p>0.05$; Figura 67B).

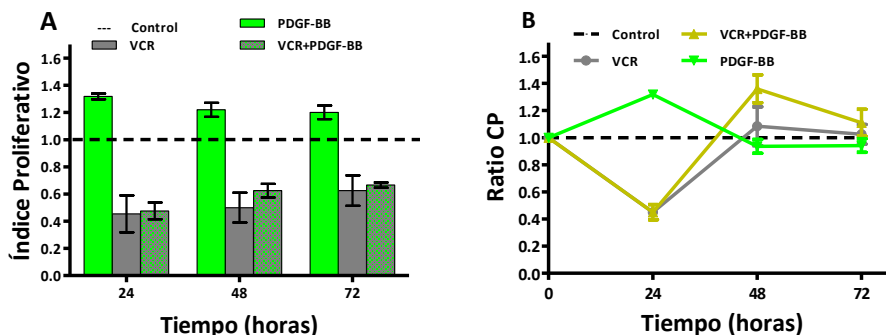


Figura 67. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.8.4. Estudio del efecto de la VCR en presencia de VEGF

La presencia de VEGF no altera de manera significativa el efecto antiproliferativo de la VCR. En presencia de VEGF, el tratamiento con VCR reduce el crecimiento respecto al control 1.72, 1.90 y 1.50 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 69A).

La ratio CP del tratamiento con VCR en presencia de VEGF presenta una cinética proliferativa 1.72 veces menor al control las primeras 24 h ($p<0.001$), se aproxima al control a las 48 h ($p>0.05$) y es 1.29 veces mayor a las 72 h ($p<0.01$; Figura 68B).

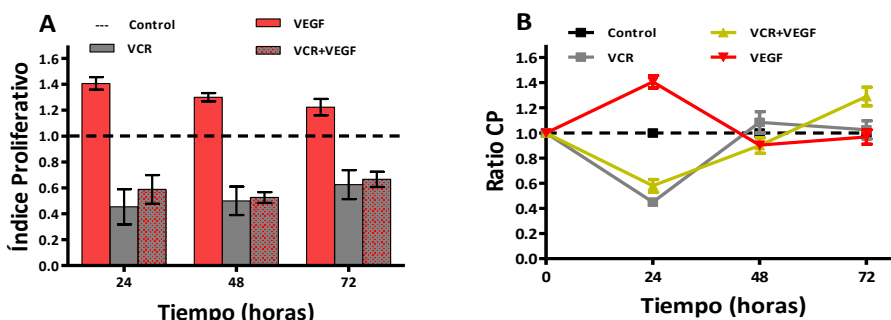


Figura 68. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.8.5. Estudio del efecto de la VCR en presencia de FGF_b

La presencia de FGF_b reduce la eficacia del tratamiento con VCR en las primeras 24 h.

En presencia de FGF_b , el tratamiento con VCR reduce el crecimiento respecto al control 1.30 veces a las 24 h y 1.60 veces a las 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 69A). Con respecto a las células tratadas con VCR en ausencia del factor, la proliferación celular aumentó 1.69 veces a las 24 h ($p < 0.001$), no existiendo diferencias significativas en el resto de los tiempos.

La ratio CP del tratamiento con VCR en presencia de FGF_b presenta una cinética proliferativa 1.30 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$), 1.20 veces menor a las 48 h ($p < 0.05$) y se iguala a las 72 h ($p > 0.05$; Figura 69B).

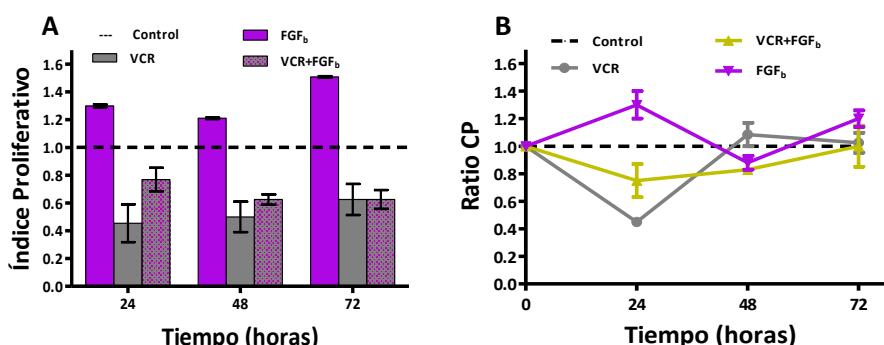


Figura 69. Efecto del VCR (5 ng/ml) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.8.6. Estudio del efecto de la VCR en presencia de EGF

La presencia de EGF en el medio de cultivo altera el efecto de la VCR sobre las células S4MH durante las primeras 48 h.

El tratamiento con VCR en presencia de EGF reduce el crecimiento 1.33 veces a las 24 h y 1.33 veces a las 48 h y 72 h respecto al control ($p < 0.001$; Figura 70A). De este modo, con respecto a las células tratadas con VCR en ausencia del factor, la proliferación celular aumentó 1.46 veces a las 24 h ($p < 0.05$), 1.43 veces a las 48 h ($p < 0.05$) y se iguala a las 72 h ($p > 0.05$).

La ratio CP del tratamiento con VCR en presencia de EGF presenta una cinética proliferativa 1.33 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$) para tender a igualarse en el resto de tiempos del estudio ($p < 0.01$; Figura 70B).

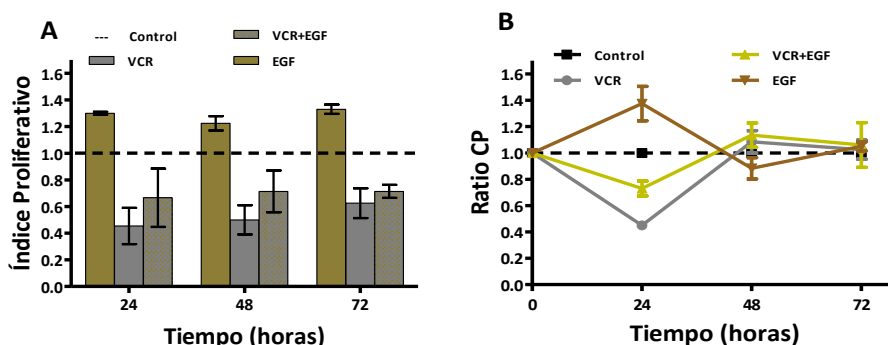


Figura 70. Efecto del VCR (5 ng/ml) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.8.7. Comparación del efecto de la VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y cinética proliferativa de las células S4MH

La VCR ve alterada su actividad en distinta medida en presencia de los factores de crecimiento, tal como se aprecia en la figura 71.

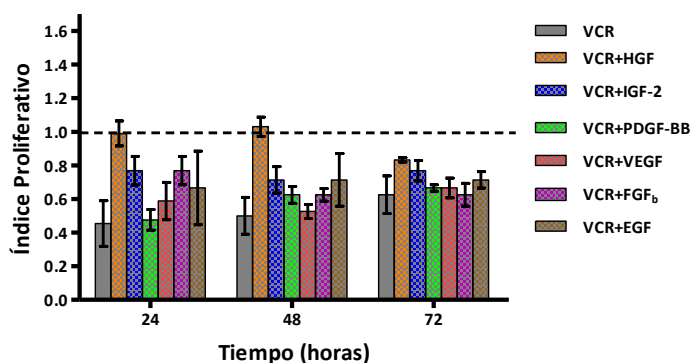


Figura 71. Comparación del efecto del tratamiento con VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación de las células S4MH.

La VCR redujo su eficacia de un modo variable para cada factor. Los factores de crecimiento que más afectan el tratamiento con VCR son el HGF, el EGF, el IGF-2, el PDGF-BB y el FGF_b, que reducen el efecto del tratamiento un 51.45%, un 29.97%, un 29.97%, un 20.0% y un 20.0%, respectivamente, a las 48h. El VEGF no altera el efecto del tratamiento en dicho tiempo (Figura 72).

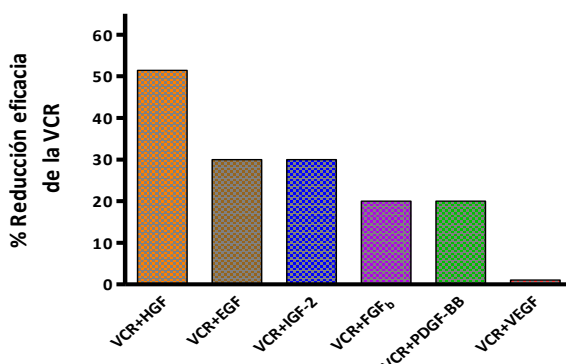


Figura 72. Efecto de la VCR (5ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento sobre la actividad de la VCR a las 48h.

En cuanto a la cinética proliferativa, la figura 73 muestra que los factores de crecimiento incrementan significativamente durante las primeras 24 h la cinética proliferativa respecto a la VCR sola (a excepción del PDGF-BB y del VEGF), si bien con el tiempo dicha cinética tiende a ajustarse al perfil cinético de dicho agente antineoplásico.

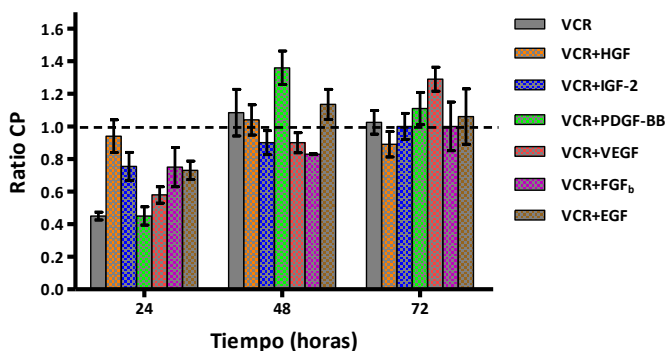


Figura 73. Comparación del efecto del tratamiento con VCR en presencia de los factores de crecimiento sobre la cinética proliferativa de las células S4MH.

IV.9. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO VCR+ATRA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

La adición de ATRA (10^{-6} M) al tratamiento con VCR (5 ng/ml) redujo significativamente la proliferación de la línea celular S4MH. Dicha reducción fue de 2.91, 2.70 y 2.30 veces con respecto al control a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 74A), lo que supone una mejora en la eficacia antiproliferativa respecto al citostático sin ningún otro agente en el medio de cultivo del 22.90% a las 24 h, del 26.0% a las 48 h y del 30.56% a las 72 h, respectivamente. En este caso, el Factor Modificador de Dosis (FMD) se sitúa en valores 0.86 a las 48 h, lo que nos indica que ambos agentes tienen un efecto aditivo.

La ratio CP experimentó un descenso de 2.91 veces respecto al control tras las primeras 24 h ($p<0.001$), para tender a los valores del control a las 48 h ($p>0.05$) y aumentar sobre dicha cinética del control 1.17 veces a las 72 h ($p<0.01$; Figura 74B).

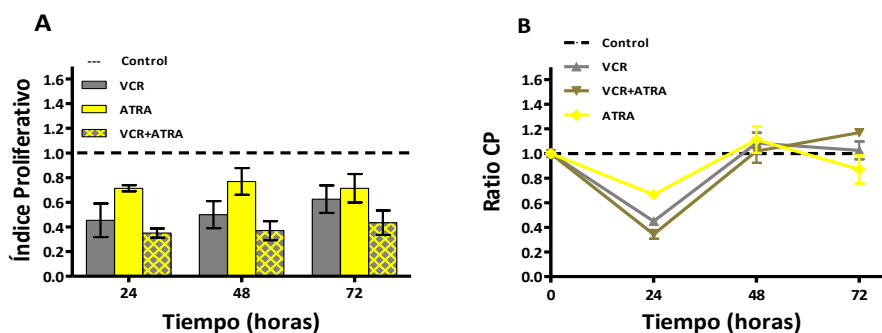


Figura 74. Efecto de la VCR (5 ng/ml) en presencia de ATRA 10^{-6} M sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO VCR+ATRA EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

IV.10.1. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de HGF

El efecto del tratamiento VCR+ATRA en presencia de HGF reduce de forma significativa la proliferación celular de modo que se tiende a mantenerse en los valores de proliferación de la VCR en ausencia del factor. Cuando se administra ATRA en combinación con VCR en presencia de HGF, se reduce la proliferación respecto al control 1.90, 1.53 y 1.70 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 75A). Dicho tratamiento reduce la proliferación con respecto a la VCR sólo 1.88, 1.58 y 1.41 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$) dando lugar a un FMD a las 48 h de 1.12 de modo que los agentes tienen un efecto sinérgico.

El tratamiento con VCR y ATRA en presencia de HGF reduce significativamente la ratio CP 1.90 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$; Figura 75B), para igualarse al control a partir de las 48 h ($p > 0.05$).

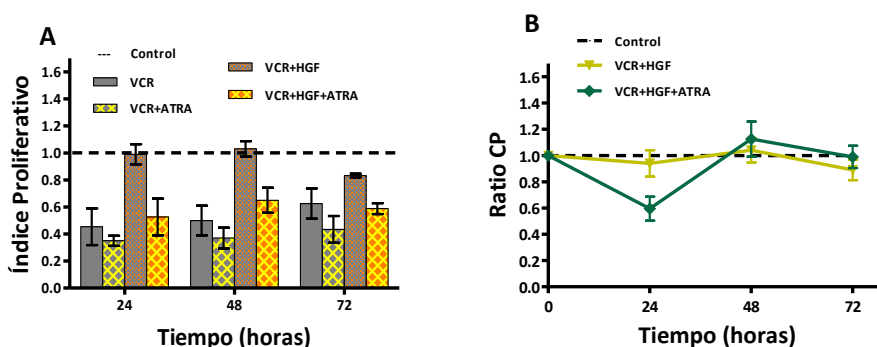


Figura 75. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10.2. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de IGF-2

El tratamiento VCR+ATRA en presencia de IGF-2 reduce de forma significativa la proliferación celular, alcanzando los valores de proliferación de la VCR en ausencia

del factor las primeras 48h, para tender a los valores del tratamiento VCR+ATRA en ausencia del factor a las 72 h.

La adición de ATRA al tratamiento con VCR en presencia de IGF-2, se reduce la proliferación respecto al control 1.80, 1.70 y 2.10 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 76A). Asimismo, el tratamiento VCR+ATRA reduce la proliferación con respecto a la VCR sólo 1.38, 1.21 y 1.61 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p<0.001$), obteniéndose un FMD a las 48 h de 1.44.

El tratamiento VCR y ATRA en presencia de IGF-2 reduce la ratio CP 1.80 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$; Figura 76B), para igualarse a la tasa del control a partir de las 48 h ($p>0.05$).

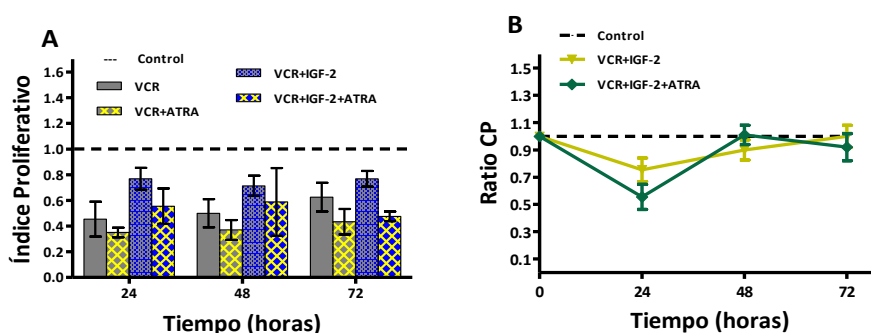


Figura 76. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10.3. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de PDGF-BB

El tratamiento VCR+ATRA en presencia de PDGF-BB reduce de forma significativa la proliferación celular alcanzando los niveles de la VCR+ATRA en ausencia del factor.

Cuando aplicamos ATRA al tratamiento con VCR en presencia de PDGF-BB, se reduce la proliferación respecto al control 2.40 veces a las 24 h, y 2.10 veces a las 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 77A). De este modo, el tratamiento

VCR+ATRA reduce la proliferación con respecto a la VCR 1.14, 1.31 ($p>0.05$) y 1.39 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p<0.05$), obteniéndose un FMD a las 48 h de 1.39.

El tratamiento con VCR y ATRA en presencia de PDGF-BB reduce la ratio CP 2.40 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$; Figura 77). Se produce un incremento de 1.20 veces a las 48 h y tiende a igualarse con la tasa del control a las 72 h ($p>0.05$).

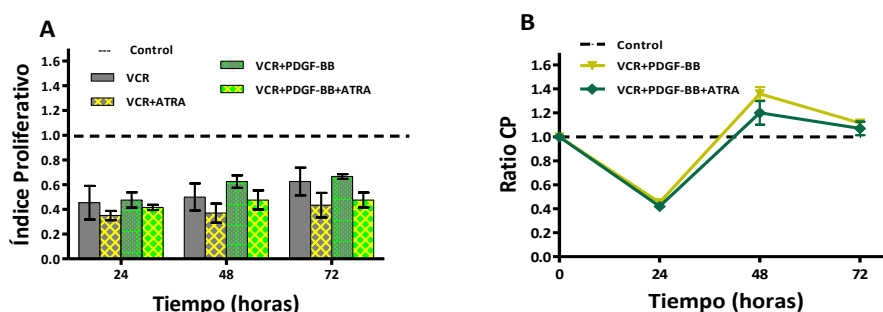


Figura 77. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10.4. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de VEGF

El tratamiento VCR+ATRA en presencia de VEGF reduce de forma significativa la proliferación celular alcanzando los valores de proliferación de dicha combinación terapéutica en ausencia del factor.

La combinación ATRA y VCR, en presencia de VEGF, produce una reducción de la proliferación respecto al control de 2.60, 2.40 y 2.10 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 78A). Este tratamiento reduce la proliferación con respecto a la VCR 1.51 veces a las 24 h ($p<0.001$), 1.26 veces a las 48 h ($p<0.05$) y 1.40 veces a las 72 h ($p<0.001$), obteniéndose un FMD a las 48 h de 0.94 (aditivo).

El tratamiento con VCR y ATRA en presencia de VEGF reduce la ratio CP 2.60 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$). A las 48 h se iguala a la tasa del control ($p>0.05$) y a las 72 h aumenta 1.21 veces por encima de los valores del control ($p<0.01$; Figura 78B).

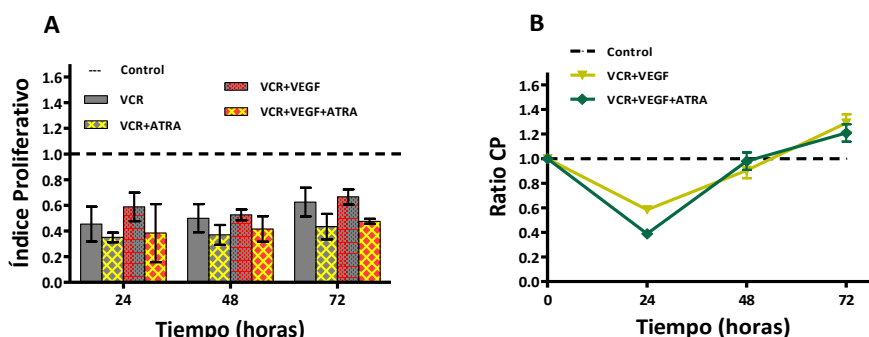


Figura 78. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10.5. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de FGF_b

La presencia de FGF_b en el medio de cultivo no altera significativamente los valores de proliferación de la combinación terapéutica VCR+ATRA en ausencia de dicho factor. Así, dicho tratamiento combinado produce una reducción de la proliferación respecto al control de 2.60 a las 24 h y 2.0 veces a las 48 h y 72 h ($p<0.001$; Figura 79A). Con respecto a la VCR sólo, el tratamiento VCR+ATRA disminuye 2.0 veces a las 24 h, y 1.25 veces a las 48 h y 72 h, obteniéndose un FMD de 1.33 a las 48 h.

La combinación de VCR y ATRA en presencia de FGF_b reduce la ratio CP 2.60 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$). A las 48 h es 1.33 veces mayor que el control ($p < 0.001$) y a las 72 h alcanza la tasa del control ($p > 0.05$; Figura 79B).

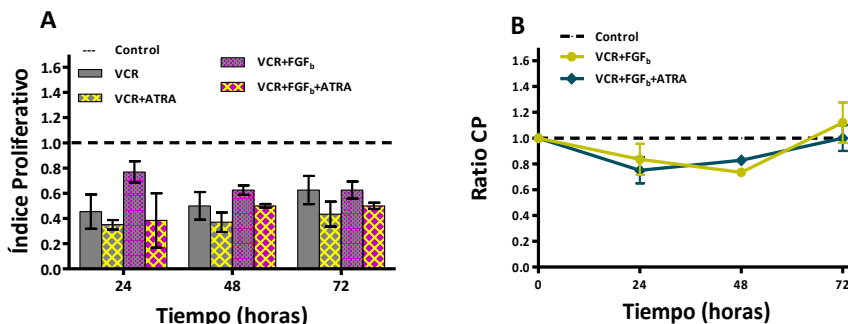


Figura 79. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10^{-6}M) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de EGF

La presencia de EGF en el medio de cultivo no altera los valores de proliferación de la combinación VCR+ATRA, en ausencia de dicho factor.

Cuando se añade ATRA al tratamiento con VCR e presencia de EGF, se produce una reducción de la proliferación respecto al control de 2.40, 2.30 y 1.90 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 80A). La reducción de la proliferación con respecto a la VCR fue de 1.60, 1.64 y 1.35 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p < 0.001$), con un FMD a las 48 h de 1.51.

El tratamiento con VCR y ATRA en presencia de EGF reduce la ratio CP 2.40 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$), para igualarse a la tasa del control en el resto de tiempos de medida ($p>0.05$; Figura 80B).

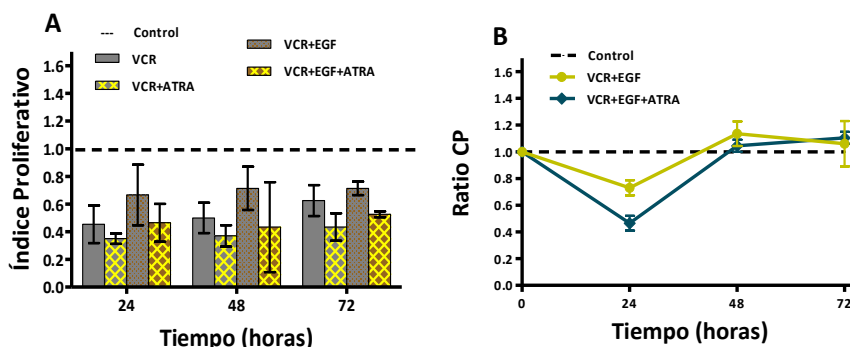


Figura 80. Efecto de la VCR (5 ng/ml) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.10.7. Comparación del efecto del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

La figura 81 muestra la comparación del efecto antiproliferativo producido por el ATRA asociado a la VCR en presencia de los diferentes factores de crecimiento.

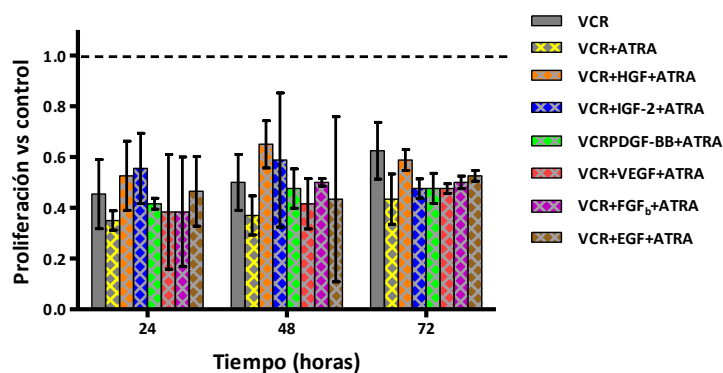


Figura 81. Comparación del efecto del tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10⁻⁶M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.

De este modo, la mayor eficacia antiproliferativa de la adición de ATRA al tratamiento con VCR se obtuvo en presencia del EGF, el HGF, el PDGF-BB, el VEGF, el FGF_b y el IGF-2, (aumento del 39.21%, un 36.89%, un 23.84%, un 20.91%, un 20% y un 17.64%, respectivamente, a las 48h; Figura 82).

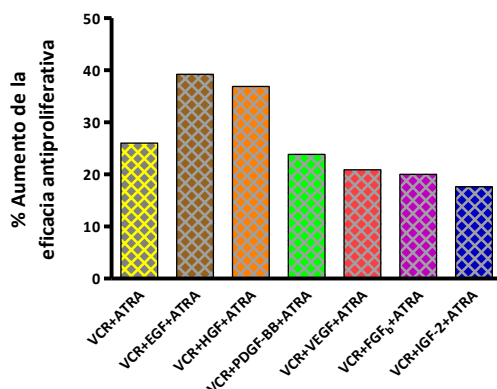


Figura 82. Efecto de la adición de ATRA (10^{-6} M) sobre la eficacia antiproliferativa del tratamiento con VCR (5ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h.

La figura 83 muestra los valores de la FMD obtenidos con el tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de los diferentes FC. Se puede observar un efecto sinérgico entre ambos agentes ante la presencia de la mayoría de los FC, a excepción del VEGF, que presenta un efecto aditivo.

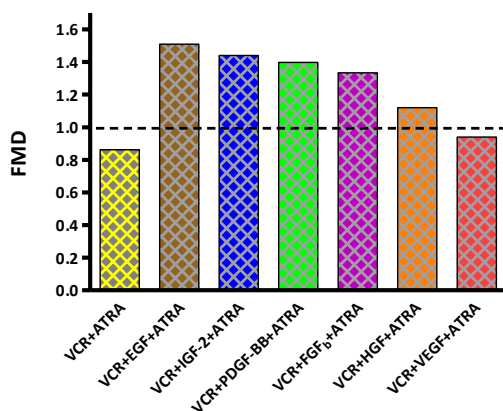


Figura 83. FMD de cada factor de crecimiento sobre el tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h.

La figura 84 ilustra la comparación de la cinética proliferativa observada tras la aplicación del tratamiento combinado VCR+ATRA en presencia de los factores de crecimiento.

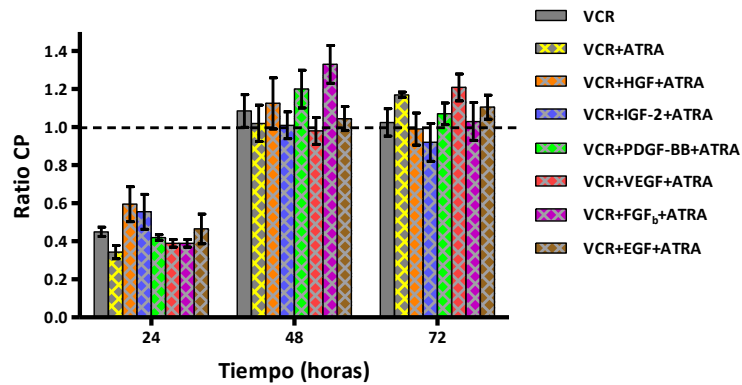


Figura 84. Comparación del efecto del tratamiento combinado VCR (5ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

IV.11. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ACD EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

IV.11.1. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de HGF

La presencia de HGF no altera significativamente el efecto antiproliferativo de la ACD. Así, se puede observar cómo se reduce la proliferación 1.90, 1.60 y 1.50 veces respecto al control a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 85A).

En relación al ratio CP, tras la reducción inicial a las 24 h (1.90 veces respecto al control), mantiene el resto de tiempos del estudio un perfil cinético similar al del citostático en ausencia del factor ($p > 0.05$; Figura 85B).

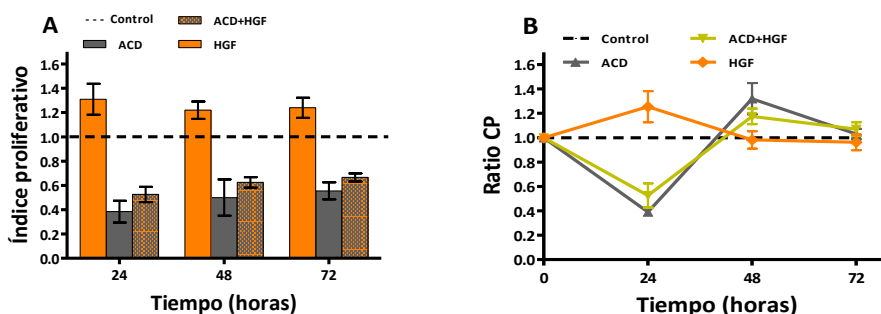


Figura 85. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.11.2. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de IGF-2

La presencia de IGF-2 no altera significativamente el efecto antiproliferativo de la ACD. De este modo, el tratamiento con ACD reduce la proliferación respecto al control 1.80 veces a las 24 h, 1.70 veces a las 48 h y 1.50 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 86A).

En lo referente a la ratio CP, tras la reducción inicial durante las primeras 24 h (1.80 veces respecto al control), el perfil cinético del tratamiento con ACD en

presencia de IGF-2 se aproxima a la tasa del control a las 48 h ($p>0.05$) y se hace 1.19 veces mayor a las 72 h ($p<0.001$; Figura 86B).

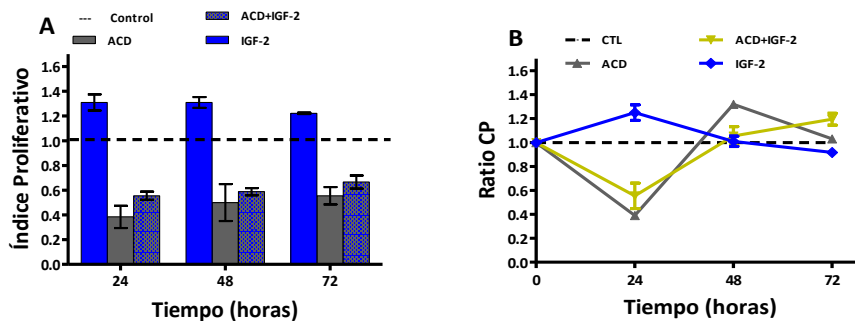


Figura 86. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.11.3. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de PDGF-BB

BB

La presencia del PDGF-BB no afecta significativamente el efecto antiproliferativo de la ACD. Así, el tratamiento con ACD reduce el crecimiento respecto al control 2.20 veces a las 24 h y 1.70 veces a las 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 87A).

La ACD en presencia de PDGF-BB presenta una ratio CP prácticamente idéntica a la de la ACD en ausencia del factor ($p>0.05$; Figura 87B).

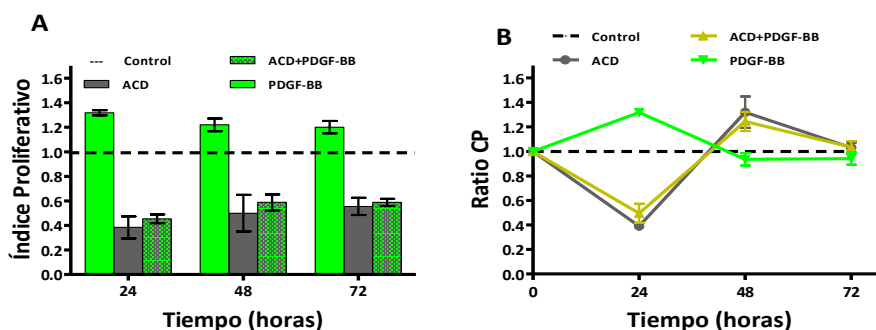


Figura 87. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.11.4. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de VEGF

La presencia del VEGF no afecta significativamente el efecto antiproliferativo de la ACD. Así, el tratamiento con ACD reduce el crecimiento respecto al control 1.90 veces a las 24 h y 1.70 veces a las 48 h y 72 h ($p < 0.001$; Figura 88A).

La ACD en presencia de VEGF presenta una ratio CP 1.90 veces menor al control las primeras 24 h ($p < 0.001$), para tender a igualarse al mismo en el resto de tiempos analizados ($p > 0.05$; Figura 88B).

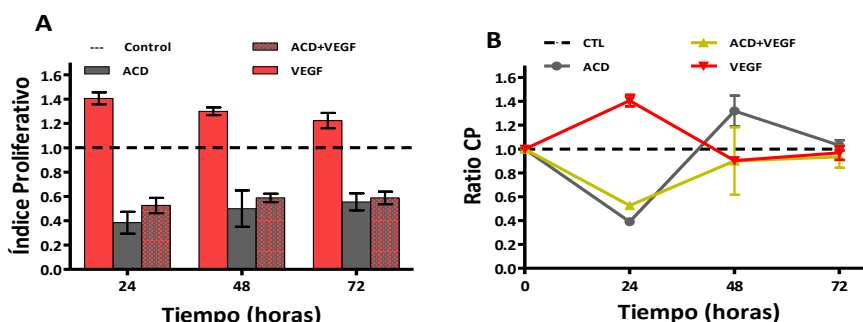


Figura 88. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.11.5. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de FGF_b

La presencia del FGF_b no afecta significativamente el efecto antiproliferativo de la ACD. De este modo, el tratamiento con ACD reduce el crecimiento con respecto al control 2.0, 1.60 y 1.50 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p < 0.001$; Figura 89A).

La ratio CP de la ACD en presencia de FGF_b presenta un perfil cinético muy similar al de la ACD en ausencia de dicho factor ($p > 0.05$; Figura 89B).

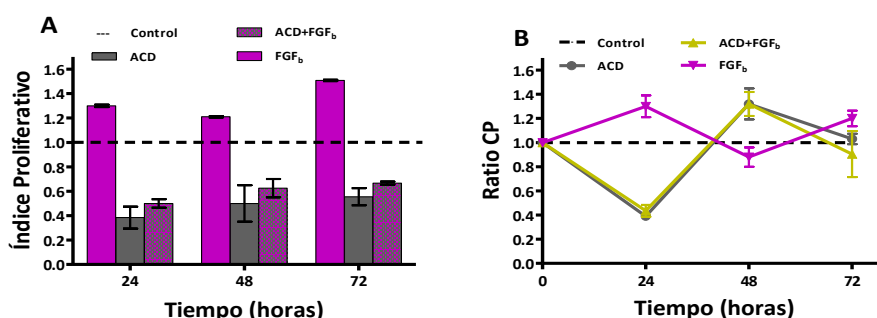


Figura 89. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.11.6. Estudio del efecto del tratamiento con ACD en presencia de EGF

La presencia de EGF no modifica significativamente el efecto de la ACD, a excepción de las primeras 24 h, donde se observa un incremento de la proliferación de 1.62 veces con respecto al tratamiento con la ACD en ausencia del factor ($p < 0.001$; Figura 90A).

La ACD en presencia de EGF presenta una cinética proliferativa 1.62 veces menor que el control las primeras 24 h ($p < 0.001$), y tiende a igualarse al mismo en el resto de tiempos del estudio ($p > 0.05$; Figura 90B).

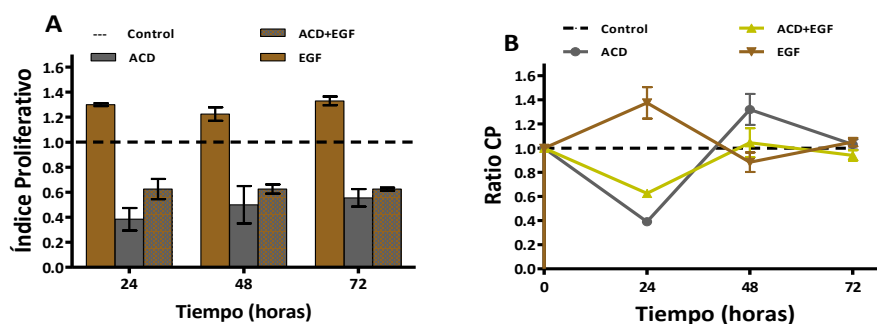


Figura 90. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.11.7. Comparación del efecto de la ACD en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y cinética proliferativa de las células S4MH

La ACD ve alterada su actividad en distinta medida en presencia de los factores de crecimiento, tal como se aprecia en la Figura 91.

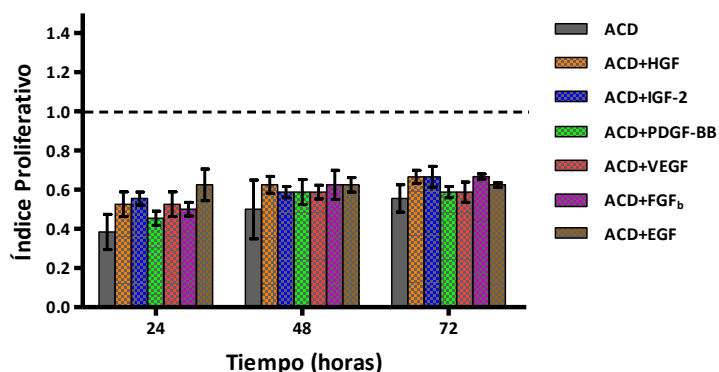


Figura 91. Comparación del efecto del tratamiento con ACD (15ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.

La presencia de los FC produce una reducción de la eficacia de la ACD que oscila entre el 15 y el 20%; sin embargo, dicho porcentaje de reducción no es significativo en ninguno de los casos (Figura 92).

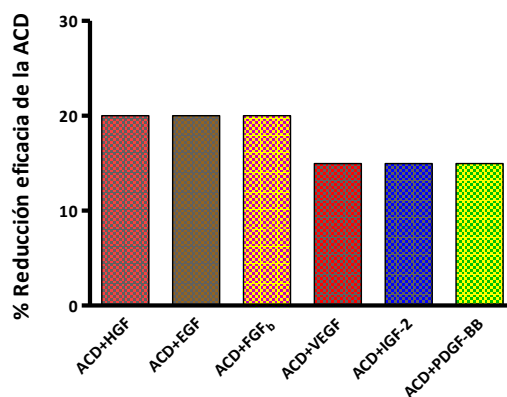


Figura 92. Efecto de la ACD (15ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento sobre la actividad de la ACD a las 48h.

En cuanto a la cinética proliferativa, la Figura 93 muestra que en presencia de los FC, la ACD mantiene su perfil cinético en ausencia de los mismos, excepto a las 24 h para todos los FC excepto el FGF_b.

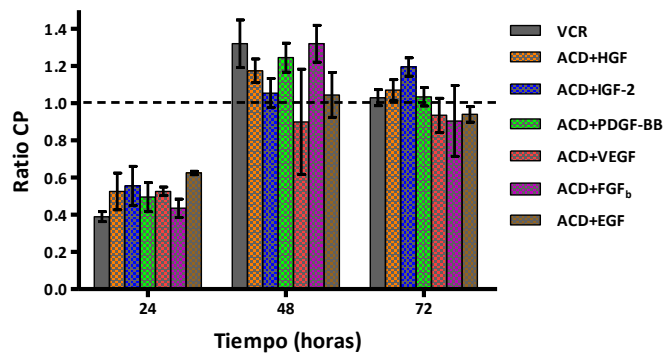


Figura 93. Comparación del efecto del tratamiento con ACD (15ng/ml) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

IV.12. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO ACD+ATRA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

La adición de ATRA (10^{-6} M) al tratamiento con ACD (15 ng/ml) redujo significativamente la proliferación de la línea celular S4MH.

Dicha reducción fue de 4.40, 3.20 y 2.80 veces respecto al control a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 94A), lo que supone una mejora en la eficacia antiproliferativa respecto al citostático aislado del 40.88%, 37.60% y 35.67% a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente. En este caso, el Factor Modificador de Dosis (FMD) se sitúa en 0.94 a las 48 h, lo que nos indica que ambos agentes presentan un efecto aditivo.

El valor de la ratio CP experimentó un descenso de 4.40 veces respecto al control tras las primeras 24 h; a las 48 h se sitúa 1.29 veces por encima del control ($p < 0.001$) y a las 72 h tiende a igualarse al mismo ($p < 0.01$; Figura 94B).

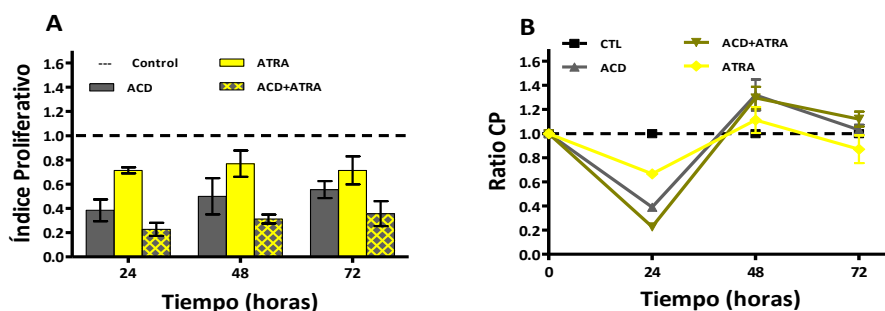


Figura 94. Efecto de la ACD (15 ng/ml) en presencia de ATRA (10^{-6} M) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13. EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO ACD+ATRA EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA CINÉTICA PROLIFERATIVA DE LA LÍNEA CELULAR S4MH

IV.13.1. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de HGF

En presencia de HGF, la adición de ATRA al tratamiento con ACD reduce la proliferación celular a valores intermedios entre la propia del fármaco y la del fármaco y el ATRA en ausencia del factor.

La adición de ATRA al tratamiento con ACD en presencia de HGF, se reduce la proliferación respecto al control 3.50, 2.50 y 2.20 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 95A). Asimismo, el tratamiento ACD+ATRA reduce la proliferación con respecto a la ACD 1.84 veces a las 24 h y 1.56 veces a las 48 h y 1.46 veces a las 72 h ($p<0.001$ dando lugar a un FMD de 1.60 a las 48 h).

La ratio CP del tratamiento ACD+ATRA en presencia de HGF se ve reducida 3.50 veces a las 24h y se incrementa 1.30 veces a las 48 h y 1.18 veces a las 72 h, respecto al control ($p<0.001$; Figura 95B).

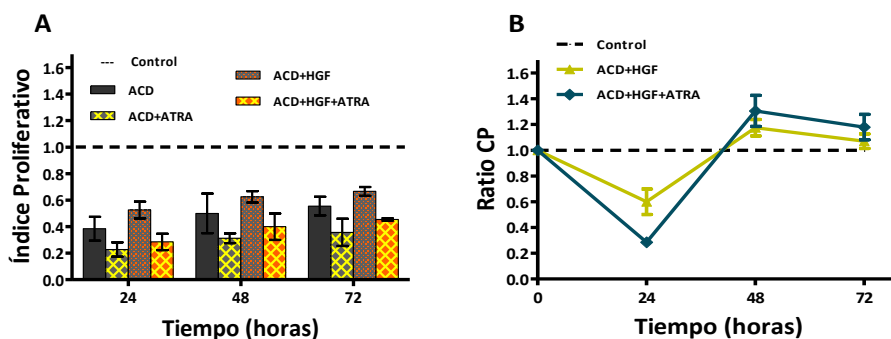


Figura 95. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de HGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13.2. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia IGF-2

En presencia de IGF-2, la adición de ATRA al tratamiento con ACD reduce la proliferación celular a valores intermedios entre la propia del fármaco y la del fármaco y el ATRA en ausencia del factor.

El tratamiento con ACD+ATRA en presencia de IGF-2, reduce la proliferación respecto al control 2.40, 2.50 y 2.30 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 96A). Este tratamiento reduce la proliferación con respecto a la ACD 1.33, 1.47 y 1.53 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p < 0.001$). El FMD a las 48 h fue de 1.45.

La ratio CP del tratamiento ACD+ATRA en presencia de IGF-2 se ve reducida 2.40 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$; Figura 96B) se iguala al control a las 48h ($p > 0.05$) y se incrementa 1.19 veces a las 72 h ($p > 0.05$).

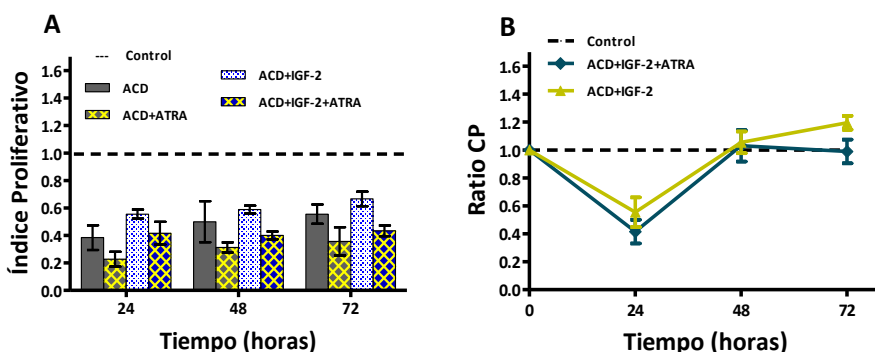


Figura 96. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de IGF-2 (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13.3. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia PDGF-BB

En presencia de PDGF-BB, la adición de ATRA al tratamiento con ACD reduce la proliferación celular a valores propios del fármaco en ausencia del factor. Así, el tratamiento ACD+ATRA en presencia de PDGF-BB, produce una reducción de la proliferación respecto al control de 2.85, 1.87 y 1.86 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p < 0.001$; Figura 97A). Con respecto al tratamiento con ACD sólo, la

adición de ATRA no produce diferencias significativas en la proliferación celular (1.09 y 1.03 veces menor a las 24 h y 72 h; $p>0.05$), lo que hace que el FMD sea 1.13.

La ratio CP del tratamiento ACD+ATRA en presencia de PDGF-BB se reduce 2.85 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$), a las 48 h se incrementa 1.24 veces ($p<0.001$) y a las 72 h, tiende a igualarse a la tasa del control ($p>0.05$; Figura 97B).

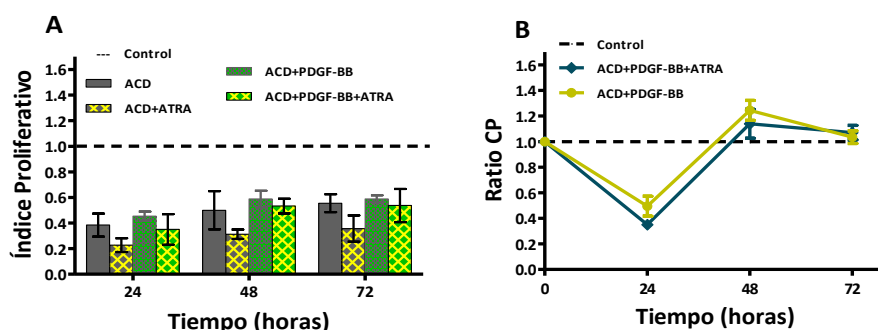


Figura 97. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de PDGF-BB (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13.4. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia VEGF

En presencia de VEGF, la adición de ATRA al tratamiento con ACD reduce la proliferación celular a valores intermedios entre la propia del fármaco y la del fármaco y el ATRA en ausencia del factor.

La adición de ATRA al tratamiento con ACD en presencia de VEGF, reduce la proliferación respecto al control de 2.80, 2.50 y 2.30 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 98A). Asimismo, el tratamiento ACD+ATRA disminuye la proliferación con respecto a la ACD 1.47 veces a las 24 h y 48 h y 1.35 veces a las 72 h ($p<0.001$), dando lugar a un FMD de 1.19 a las 48 h.

La ratio CP del tratamiento ACD+ATRA en presencia de VEGF se reduce 2.80 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$) a las 48 horas se incrementa 1.12 veces ($p<0.05$) y a las 72 h 1.17 veces ($p<0.001$; Figura 98B).

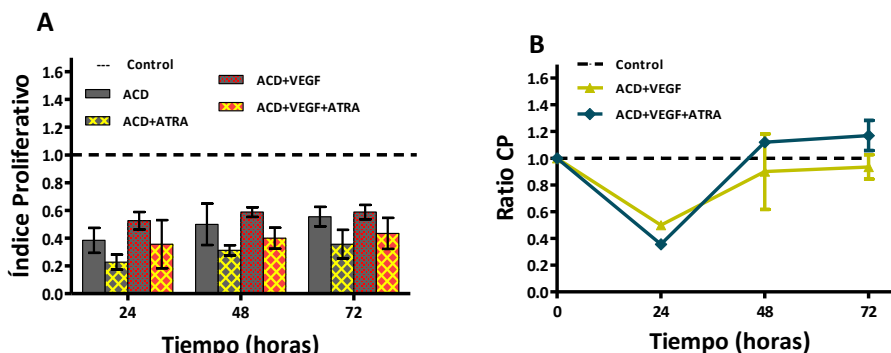


Figura 98. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de VEGF (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13.5. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia FGF_b

En presencia de FGF_b la adición de ATRA al tratamiento con ACD no altera la proliferación celular con respecto a la proliferación del fármaco y el ATRA en ausencia del factor. Así, el tratamiento con ACD+ATRA en presencia de FGF_b , reduce la proliferación respecto al control 2.90, 3.0 y 2.80 veces a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente ($p<0.001$; Figura 99A). De este modo, en presencia de FGF_b , el tratamiento combinado disminuye la proliferación con respecto a la ACD 1.45, 1.87 y 1.86 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p<0.001$). El FMD fue 1.77 a las 48 h.

La ratio CP del tratamiento con ACD y ATRA en presencia de FGF_b reduce la tasa de crecimiento 2.90 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p<0.001$), se iguala a la tasa del control a las 48 h ($p>0.05$) y se hace 1.17 veces mayor a las 72 h ($p>0.001$; Figura 99B).

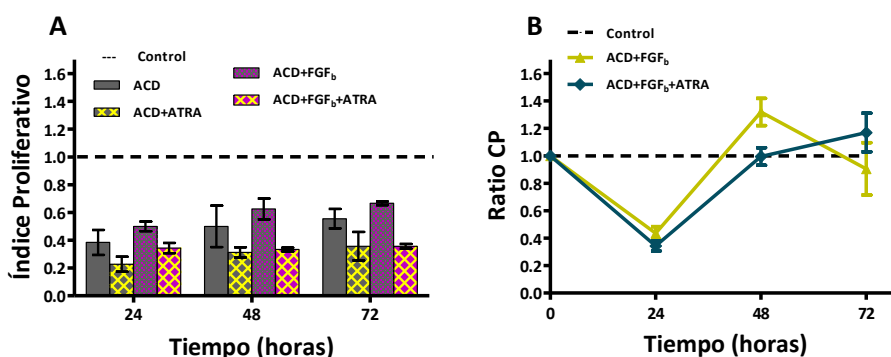


Figura 99. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10^{-6} M) en presencia de FGF_b (10 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13.6. Estudio del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia EGF

En presencia de EGF, la adición de ATRA al tratamiento con ACD reduce la proliferación celular a valores intermedios entre la propia del fármaco y la del fármaco y el ATRA en ausencia del factor.

La combinación ACD+ATRA en presencia de EGF reduce la proliferación respecto al control 2.70 veces a las 24 h y 48 h y 2.20 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 100A). Con respecto a la ACD aislada, dicho tratamiento reduce la proliferación 1.69, 1.69 y 1.37 veces a las 24 h, 48 h y 72 h ($p < 0.001$), lo que da lugar a un FMD de 1.68.

La ratio CP del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de EGF se reduce 2.70 veces respecto al control en las primeras 24 h ($p < 0.001$), para tender a igualarse al perfil cinético del control a las 48 h ($p > 0.05$) y aumentar 1.17 veces a las 72 h ($p < 0.001$; Figura 101B).

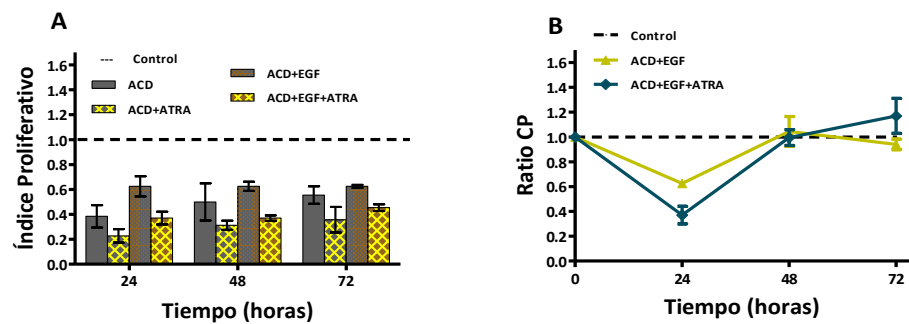


Figura 100. Efecto de la ACD (15 ng/ml) y del ATRA (10⁻⁶M) en presencia de EGF (25 ng/ml) sobre las células S4MH; (A) Índice Proliferativo; (B) Ratio CP.

IV.13.7. Comparación del efecto del tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de los factores de crecimiento sobre la proliferación y la cinética proliferativa de las células S4MH

La figura 101 muestra la comparación del efecto antiproliferativo producido por el ATRA asociado a la ACD en presencia de los diferentes factores de crecimiento.

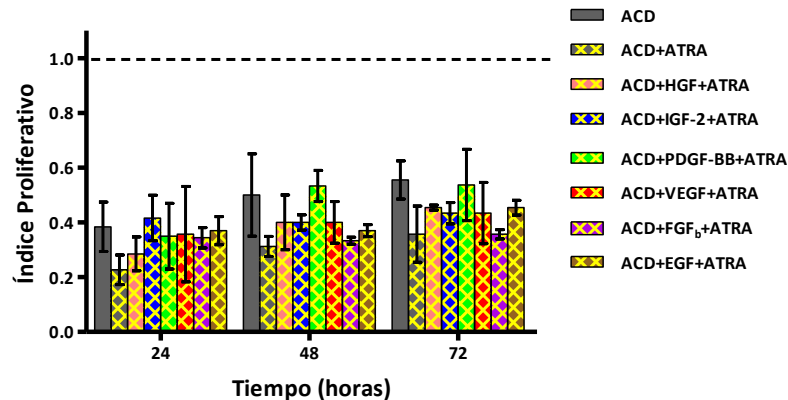


Figura 101. Comparación del efecto del tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10⁻⁶M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Índice Proliferativo.

Como se observa en la Figura 102, el mayor aumento en la eficacia antiproliferativa de la adición de ATRA al tratamiento con ACD se obtuvo, en orden decreciente, en presencia del FGF_b, el EGF, el HGF, el IGF-2, el VEGF y el PDGF-BB (aumento del 46.72%, 40.8%, 36.0%, 31.97%, 31.97% y 9.35% respectivamente, a las 48h).

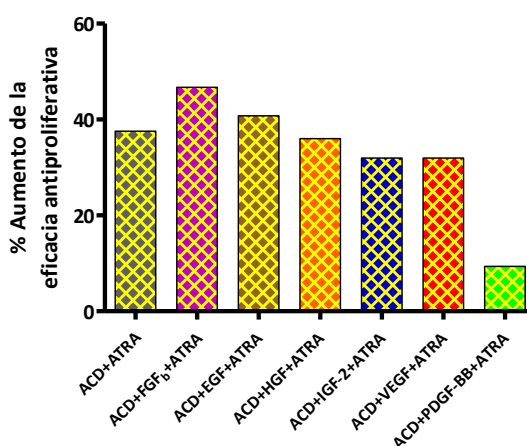


Figura 102. Efecto del tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre la RA a las 48h.

La figura 103 muestra los valores de la FMD obtenidos con el tratamiento combinado ACD+ATRA en presencia de los diferentes FC. Se puede observar un efecto sinérgico entre ambos agentes ante la presencia de la todos los FC, en mayor o menor medida

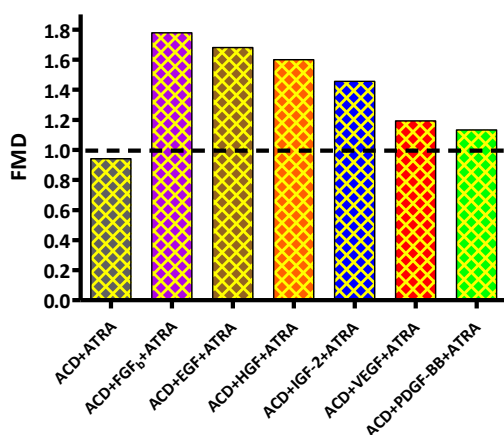


Figura 103. FMD de cada factor de crecimiento sobre el tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento a las 48h.

En cuanto a la cinética proliferativa, la Figura 104 muestra que, en general, y en presencia de los FC, la ACD mantiene su perfil cinético en ausencia de los mismos, excepto a las 24 h para todos los FC.

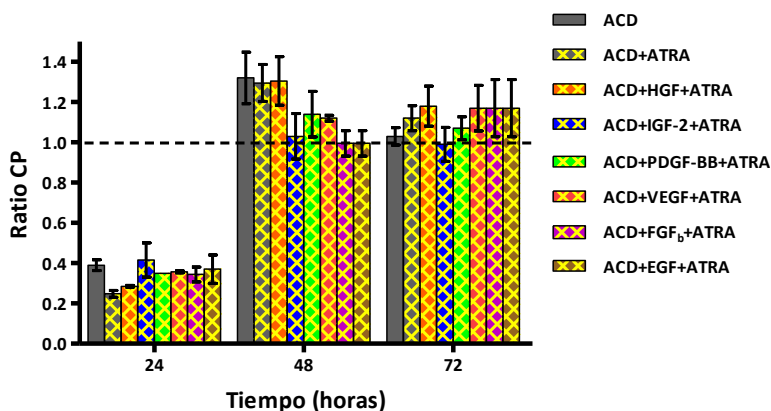


Figura 104. Comparación del efecto del tratamiento combinado ACD (15ng/ml)+ATRA (10^{-6} M) en presencia de los factores de crecimiento sobre las células S4MH. Ratio CP.

V. DISCUSIÓN

Los modestos resultados obtenidos por la quimioterapia convencional en el tratamiento del RMS metastático y las escasas opciones terapéuticas disponibles, hacen necesaria la investigación de nuevos agentes antitumorales frente a dianas que sean activas en este contexto.

La quimioterapia convencional del RMS metastático incluye agentes como la VCR y la ACD, habitualmente en combinación, aunque esta estrategia terapéutica no ha logrado aumentar el tiempo libre de tumor ni la tasa de supervivencia a los 5 años, con respecto al tratamiento con agente único. La adición a dicha combinación de otros fármacos como la ifosfamida y la ciclofosfamida tampoco mejora la respuesta antitumoral ni la tasa de supervivencia (Raney *et al* 2011).

Otro agente quimioterápico, en particular el melfalán, ha sido empleado en combinación con el $TNF\alpha$. Dicha combinación terapéutica reduce la resistencia tumoral al tratamiento, mediante la regulación de la expresión de las caspasas 2 y 3 (Klüttermann *et al*, 2006). En otros estudios (Lashkari *et al*, 2009), el melfalán, administrado en solitario y a altas dosis, logra tasas de supervivencia totales del 31%, y libres de tumor a los 5 años del 23%. Sin embargo, el tratamiento obliga a utilizar dosis crecientes, con el consiguiente incremento en la toxicidad.

Se están investigando nuevas estrategias terapéuticas innovadoras que permitan disminuir la citotoxicidad de la quimioterapia, aumentar la supervivencia global y reducir las secuelas derivadas del tratamiento (Kang *et al*, 2011). Así, en el campo de los ensayos clínicos, se están llevando a cabo: *i*, protocolos de inmunoterapia basados en el uso de células *killer* dependientes de citocinas, que lisan las células previamente inmunomarcadas (Kuçi *et al*, 2010); *ii*, la selección de alteraciones genéticas presentes en los RMS que puedan representar potenciales dianas terapéuticas (Schäfer *et al*, 2010); *iii*, el uso de nuevos agentes como el ácido betulínico en el control de la proliferación mediante la inducción de la apoptosis (Eichenmüller *et al*, 2010) y *iv*, la restauración de las funciones normales de los genes implicados en la proliferación y su control, como *Hedgehog* y p53 (Eichenmüller *et al*, 2010; Xu *et al*, 2010).

Además, existen resultados prometedores con agentes como la gemcitabina como agente único (Wagner-Bohn *et al*, 2006) o en combinación con el docetaxel (Rapkin *et al*, 2012); la temozolomida (De Sio *et al*, 2006) utilizada de forma aislada o en combinación con el inhibidor de TKs erlotinib (Jackaki *et al*, 2008) e imatinib, el cual es un agente inhibidor de TKs y c-Kit (Taniguchi *et al*, 2008).

En nuestro estudio, con el objetivo de comprobar el efecto de la quimioterapia convencional sobre la línea tumoral de RMS S4MH, analizamos el efecto antiproliferativo *in vitro* de algunos de los fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento del RMS como son el melfalán, la VCR y la ACD. Hemos observado cómo la ACD fue el fármaco más efectivo en reducir la proliferación celular, si bien no existen diferencias significativas respecto a los otros dos fármacos. Cabe reseñar que, tal y como se observa en los resultados del análisis de la cinética proliferativa (ratio CP), transcurridas las primeras 24 horas se produce un efecto rebote de la proliferación, de forma que este valor se aproxima al del control a las 72 horas, tanto para la ACD como para la VCR.

Múltiples estudios *in vitro*, utilizando el modelo de RMS, han demostrado la importancia del microambiente en el desarrollo del tumor primario y en la formación de metástasis. La existencia de FC en dicho microambiente es decisiva en la inducción del desarrollo tumoral metastático, a través de diferentes vías de señalización intracelular como Met, PKC, Raf-MAPK, PI3K, Jak/STAT. Además, se ha demostrado que la acción de dichos FC es uno de los principales mecanismos de resistencia, pudiendo incluso actuar como citoprotectores frente a la muerte celular por citotoxicidad (Bowres *et al*, 2000; Thimmaiah *et al*, 2010; Wang *et al*, 2010). Este efecto puede ser, entre otros, una de las causas de la recidiva tumoral tras la cirugía, lo cual constituye un problema clínico de gran relevancia.

Una de las razones que explican este hecho es la liberación de FC tras la resección quirúrgica de metástasis. Un ejemplo de ello es la hepatectomía, donde los FC son responsables no sólo de la regeneración del hígado, sino también del estímulo proliferativo de las células tumorales. Nuestro grupo de investigación ha

demostrado cómo el RMS metastático responde a los mitógenos asociados a la regeneración hepática inducida tras la hepatectomía (García Alonso *et al*, 2003; García Alonso *et al*, 2008).

Se han asociado diferentes FC con el desarrollo del RMS metastático (Lukasiewicz *et al*, 2009; Martins *et al*, 2011; Schiavetti *et al*, 2012) y otros tipos de tumores (Palomares *et al*, 2009; McDermott *et al*, 2009; Caramés *et al*, 2010; Wysoczynski *et al*, 2010; Liu *et al*, 2010; Houghton *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2011) y su implicación en la quimiorresistencia. Entre los FC implicados cabe destacar al HGF, el FGF, el VEGF, el PDGF, el IGF y el EGF.

Así, se ha demostrado que el HGF protege a las células tumorales frente a la toxicidad y apoptosis inducida por agentes que dañan el ADN, tales como las radiaciones ionizantes y la adriamicina (Shen *et al*, 2007), pudiendo contribuir a la resistencia de las células de RMS al tratamiento convencional (Jankowski *et al*, 2003). Por otro lado, el efecto del HGF parece depender del tipo tumoral, de modo que este factor sensibiliza las células de cáncer de ovario a los agentes paclitaxel y cisplatino (Bardella *et al*, 2007), mientras que induce resistencia al cisplatino en células de cáncer de pulmón (Chen *et al*, 2008).

Varios estudios han señalado el efecto del VEGF en la reducción de la eficacia de la terapia hormonal en el cáncer de mama (Qu *et al*, 2008). También se ha observado que disminuye la respuesta a los fármacos en la leucemia mieloide (de Jonge *et al*, 2008) y que los efectos inhibitorios de la doxorubicina (adriamicina) son mínimos en presencia de sobreexpresión de VEGF en el SPB (Zhang *et al*, 2006).

En el caso del EGF, está ampliamente demostrado que reduce la respuesta de las células tumorales a los compuestos citotóxicos y a la radioterapia (Schmidt *et al*, 2002; Caramés *et al*, 2010). Se ha descrito que el EGFR aumenta la resistencia al 5-fluorouracilo (5-FU) y que dicho fármaco es capaz de activar el EGFR, confiriendo a las células tumorales protección frente al tratamiento quimio y radioterápico (Hiro *et*

al, 2008). Estrategias terapéuticas con cetuximab frente al EGFR se han desarrollado recientemente con prometedores resultados en RMS (Hermann *et al*, 2010).

Por otro lado, el PDGF ha mostrado su capacidad protumoral en diversos tipos tumorales como la leucemia mielocítica crónica, el osteosarcoma y los tumores GIST. Por esta razón, se utiliza imatinib y sunitinib como terapia para la inactivación de los receptores específicos del PDGF o la inactivación de la cascada enzimática que comienza con la unión del ligando al receptor (McDermott *et al*, 2009; Chen *et al*, 2009).

Se ha asociado la existencia de mutaciones del FGFR4 en el 7-8% de los tumores de RMS (Taylor *et al*, 2009). Una elevada expresión de FGFR4 está asociada con un estadio tumoral avanzado y la reducción de la supervivencia en este tipo de tumor (Baird *et al*, 2005). De hecho, se ha demostrado una mayor frecuencia de la translocación cromosómica en el subtipo ARMS y que la inhibición del FGFR4 reduce la proliferación celular y el desarrollo de metástasis. Otros miembros de la familia de receptores de FGF, como el FGFR1 y el FGFR2 se encuentran también sobreexpresados en el RMS (Missiaglia *et al*, 2009), siendo las líneas celulares de RMS con FGFR3 más tumorigénicas que las que no lo presentan (Hirotsu *et al*, 2009). Además, el FGF₆ es un factor proangiogénico implicado en el desarrollo de tumores de páncreas (Whipple *et al*, 2011), mama, pulmón, próstata (Wesche *et al*, 2011) y algunos tipos de leucemias (Wellbrock *et al*, 2011).

En relación con el IGF-2, existe evidencia de su implicación en el desarrollo tumoral, en especial de tumores pediátricos, no sólo del RMS (Rikhs *et al* 2009; Wang *et al*, 2010), sino también de diversos tipos de cáncer como el sarcoma sinovial, el leiomiomasarcoma, el sarcoma de Ewing, el osteosarcoma y el tumor de Wilm (Wang *et al*, 2010).

Por estas razones, en la actualidad, los FC son considerados como importantes dianas terapéuticas; así, se han desarrollado agentes inhibidores de los FC para su utilización de forma aislada o en combinación con la quimioterapia. En

este sentido, una línea en estudio es la de la inhibición terapéutica de las TKs implicadas en la señalización de los FC que participan en el desarrollo del RMS, mediante el uso de anticuerpos monoclonales que bloqueen los FC o sus receptores (Croze *et al*, 2011).

En nuestro estudio, hemos observado que los FC mencionados ejercen un efecto inductor de la proliferación sobre las células de RMS S4MH, siendo el VEGF el que mayor efecto produjo seguido de los factores HGF, IGF-2, PDGF-BB, FGF_b y siendo el EGF el FC que ejerció un menor efecto inductor.

Una vez establecido el papel inductor de la proliferación de los FC sobre nuestra línea de RMS S4MH, procedimos a analizar la influencia de la presencia de los mismos en la respuesta de dicha línea a cada uno de los tres agentes quimioterápicos utilizados.

Como se ha señalado anteriormente, en ausencia de los FC, el fármaco que mayor efecto antiproliferativo mostró fue la ACD, seguido de la VCR y el melfalán. Pudimos observar que el melfalán, en presencia de HGF, el VEGF, el PDGF-BB y el IGF-2 ve reducida su eficacia. Estos resultados se han descrito en otras líneas tumorales como el mieloma múltiple para el VEGF (Podar *et al*, 2009) y el neuroblastoma para el PDGF-BB (Palmberg *et al*, 2009).

En el caso de la VCR, se observó que los FC que, en mayor medida, redujeron la eficacia del fármaco fueron el HGF, el EGF, el IGF-2, el PDGF-BB y el FGF_b. Este efecto reductor ha sido demostrado también por otros autores, para la vía de señalización dependiente de FGF en cáncer de colon (Wasylyk *et al*, 2008), en ensayos preclínicos de sarcomas de Ewing para el receptor de IGF-2 (Manara *et al*, 2007), en estudios *in vitro* para el IGF-2 con células de cáncer de colon (Carroll *et al*, 2009), así como en tumores epiteliales para el EGF (Sabbah *et al*, 2008). Por el contrario, la eficacia de la VCR no se ve afectada por la presencia de VEGF.

El último de los fármacos estudiados, la ACD, también ve reducida su eficacia de forma significativa en presencia de EGF, FGF_b y HGF, y en menor medida de VEGF, IGF-2 y PDGF-BB. Resultados similares se han obtenido también en el caso del EGF para el carcinoma escamoso, de próstata y el glioblastoma (Husvik *et al*, 2009; Li *et al*, 2009; Cai *et al*, 2009); en el caso del HGF para el cáncer de pulmón y hepatoblastoma (Siegfried *et al*, 2007; Tomizawa *et al*, 2007); y con el VEGF, para el cáncer renal, de mama y pancreático (Fukasawa *et al*, 2007; Hyder *et al*, 2009; Basu *et al*, 2010).

De este modo, la eficacia de la quimioterapia se ve reducida en función del FC presente y del agente quimioterápico utilizado. Así, la eficacia de la VCR se redujo en un 20-51%, la de la ACD en un 15-20% y la del melfalán en un 25-40%, dependiendo del FC presente en el momento de la administración del quimioterápico. En este sentido, uno de los principales FC que, de forma general, resta eficacia a los tres fármacos ensayados fue el HGF. Este factor fue el que produjo la máxima reducción en el efecto de la VCR (51.45%) y del melfalán (40%); en el caso de la ACD, dicho FC redujo un 20% la eficacia, compartiendo la máxima reducción con el FGF_b y el EGF.

Esta reducción en la eficacia de los agentes citostáticos, podría justificar, al menos en parte, el fracaso de la quimioterapia y la elevada tasa de recidiva del RMS metastático, lo cual obliga a buscar nuevas estrategias de abordaje terapéutico para el RMS.

Los mecanismos moleculares por los cuales los FC inducen resistencia frente a los fármacos antitumorales continúan siendo poco conocidos. En este sentido, la reducción del efecto de los fármacos que hemos podido observar en este estudio se puede fundamentar en varias razones. Por un lado, los FC inducen la proliferación celular y la activación de vías antiapoptóticas a través de proteínas como Bcl-xL (Mayeenuddin *et al*, 2010). Por otra parte, se ha sugerido que los FC pueden inducir a su vez el aumento de los procesos de reparación del ADN (Hiro *et al*, 2008; Marchbank *et al*, 2011). Además, los FC dan lugar a un incremento de los niveles de

GSH, mecanismo de defensa celular frente al estrés oxidativo y contra el efecto de la radiación y algunos quimioterápicos (Wu *et al*, 2004).

Otro posible mecanismo implica a NF- κ B, factor de transcripción fundamental en la señalización de los FCs, que actúa como molécula clave para la supervivencia celular. El NF- κ B se activa durante la inflamación y la carcinogénesis. De hecho, se ha demostrado la implicación de este factor de transcripción en la proliferación, la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis, la invasión tumoral y la producción de metástasis (Kleiner-Hancock *et al*, 2010; Lee *et al*, 2011). Además, juega un papel crucial en la inducción de la quimiorresistencia (Hbibí *et al*, 2008). En este sentido, factores como HGF y EGF han demostrado su actividad protectora tumoral frente a agentes antineoplásicos al activar NF- κ B (Moumen *et al*, 2007; Sethi *et al*, 2007).

Otro aspecto importante del NF- κ B es su dependencia del estado redox intracelular. Así, la activación de NF- κ B precisa de un control de los niveles intracelulares de GSH para que su unión al ADN sea óptima (Cristofanon *et al*, 2009). Se ha sugerido que uno de los mecanismos de resistencia al tratamiento quimioterápico convencional es el efecto de los FCs sobre los niveles de GSH. Así, la presencia de FCs induce un incremento de los niveles de GSH, haciendo a las células menos sensibles a los efectos del fármaco (Palomares *et al* 2009).

En la actualidad, se están analizando diferentes terapias alternativas, que persiguen mitigar la sensibilidad de las células tumorales a los FC, mediante anticuerpos que se unen al receptor, fármacos que interfieran en la vía de señalización intracelular del FC y nuevos compuestos que, combinados con la terapia convencional, reduzcan la resistencia tumoral. Dentro de este último grupo, se encuentran los agentes inductores de la diferenciación celular, entre los que cabe destacar a los retinoides. Recientes estudios confirman el posible éxito de las denominadas terapias diferenciadoras (Wang *et al*, 2012).

Los retinoides ejercen un efecto diferenciador sobre numerosos tipos de células tumorales (Barlow *et al*, 2006) y así, se han aplicado como terapia

antitumoral en la leucemia promielocítica y se está estudiando su utilización en el cáncer de cérvix, de próstata, de mama, de piel, de pulmón, de endometrio, de colon y neuroblastoma.

Estos derivados de la vitamina A actúan a través de los receptores nucleares dependientes de ligando (RAR y RXR), con los que se unen a secuencias específicas de ADN (RAREs), modulando la expresión de gran cantidad de genes.

Los retinoides producen un efecto sobre el metabolismo oxidativo celular, al inducir la producción de MROS (Castro *et al*, 1996; Palomares *et al*, 2006). Los retinoides tienen también un efecto directo sobre los mecanismos que regulan la apoptosis celular, mediante la activación de la cascada enzimática de la caspasa 3, 8 y 9 (Han *et al*, 2010; Di Francesco *et al*, 2011), el gen preapoptótico p53 (Lim *et al*, 2011) y la disminución de la expresión de los genes antiapoptóticos Bcl-2, MCL-1, LTBR y BAG3 (Karabulut *et al*, 2010; Gui *et al*, 2011).

En este estudio hemos utilizado el derivado natural más activo de la vitamina A, el ATRA, que es, a su vez, uno de los retinoides clásicos más utilizados en ensayos *in vitro* sobre líneas celulares de RMS (Barlow *et al*, 2006; Ohi *et al*, 2007).

El tratamiento con ATRA produjo un efecto antiproliferativo de la línea de RMS S4MH, lo cual concuerda con estudios previos de nuestro grupo (Castro *et al*, 2006) y con otros autores que, además, asociaban esta reducción proliferativa a una disminución de los niveles de glutatión (GSH) intracelular (Khanduja *et al*, 2008; Xu *et al*, 2010). Dicho efecto resultó ser dosis dependiente, de modo que la exposición de las células a concentraciones bajas frena el ciclo celular, al igual que se observa en otros modelos tumorales (Dai *et al*, 2011; Froeling *et al*, 2011), mientras que al aplicar dosis mayores se induce apoptosis (Lu *et al*, 2010; Dhandapani *et al*, 2011).

Hemos observado que el ATRA es capaz de revertir el estímulo proliferativo de los FC en la línea S4MH. Así, la reducción más importante se produjo en el VEGF (45.33%), pero en todos los casos la reducción del efecto inductor proliferativo ejercido por el FC nunca fue inferior al 25%. Estos resultados concuerdan con los de

otros autores para otras líneas tumorales, principalmente para el VEGF en la línea tumoral de próstata, el EGF en tumores de mama o el IGF en el cáncer gástrico (Nahum *et al*, 2006; Hameed *et al*, 2008; Hishiki *et al*, 2011).

Teniendo en cuenta, además, la influencia de los FC en la respuesta al efecto de los citostáticos, a continuación se analizó el efecto de la adición del ATRA a dichos fármacos en ausencia y en presencia de los FC.

En primer lugar, analizamos qué combinación terapéutica producía un mayor efecto antitumoral en ausencia de los FC. De este modo, fue posible observar que la combinación de ATRA con los fármacos incrementa el efecto antitumoral respecto al quimioterápico aislado. Dicho efecto fue aditivo para todos ellos, si bien la combinación con ACD (FMD= 0.94) produjo un efecto ligeramente superior que con el melfalán (FMD=0.92) y menor con la VCR (FMD=0.86). Estos resultados concuerdan con la bibliografía, si bien en la misma los estudios se refieren a otros tipos celulares (Alique *et al*, 2006; Alique *et al*, 2007; Allen *et al*, 2010; Streb *et al*, 2011). Para el caso concreto del RMS no hemos podido encontrar bibliografía previa en este sentido.

Una vez analizado el beneficio de la combinación de los agentes quimioterápicos y el ATRA en ausencia de los FC, se abordó el análisis del efecto de dichos FC sobre la eficacia de la combinación quimioterápico+ATRA.

Como se ha comentado anteriormente, el ATRA por sí mismo es capaz de revertir el estímulo proliferativo de los FC. Este efecto permitió que la adición de ATRA a los agentes quimioterápicos diera lugar a un efecto antiproliferativo superior al tratamiento con los agentes utilizados de forma aislada.

Así, pudimos observar que la adición de ATRA al tratamiento con melfalán en presencia de cualquiera de los FC produjo un efecto antitumoral superior al de la utilización aislada del melfalán, con un rango de aumento de eficacia entre el 29 y el 54%. Este efecto hace que, para los FC empleados en el estudio, el estímulo proliferativo que generan sea revertido al emplear ATRA junto con el fármaco,

recuperando el melfalán su capacidad antitumoral. Además, en presencia de los FC, el efecto del tratamiento melfalán+ATRA tiene carácter sinérgico.

En el caso del tratamiento con VCR, observamos que la adición de ATRA permitió contrarrestar significativamente el efecto de los FC. El rango de incremento de la eficacia del fármaco oscila entre el 17 y el 39%. En este caso, se observa que la adición de ATRA permite recuperar la capacidad antitumoral original del fármaco para casi todos los FC estudiados, a excepción del IGF-2. Al igual que en el caso del melfalán, el efecto del tratamiento VCR+ATRA en presencia de los FC, tiene carácter sinérgico.

Finalmente, en el caso del tratamiento con ACD, es necesario tener en cuenta que la presencia de los FC no modifica significativamente su eficacia antitumoral. No obstante, la adición de ATRA mejora la eficacia terapéutica del fármaco en un rango que oscila entre el 9 y el 46%, Además, en presencia de los FC, el efecto del tratamiento ACD+ATRA tiene carácter sinérgico.

Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, que los agentes inductores de la diferenciación, como el ATRA, pueden reducir o contrarrestar el estímulo protumoral de los FC, mejorando así la eficacia antitumoral de los agentes quimioterápicos.

VI. CONCLUSIONES

1. Los fármacos actinomicina D (ACD), vincristina (VCR) y melfalán reducen la proliferación celular de la línea de rabdomiosarcoma murino S4MH.
2. La adición del ácido *all trans* retinoico (ATRA) al tratamiento con ACD, VCR o melfalán, incrementa el efecto antiproliferativo de estos quimioterápicos con respecto al efecto obtenido con la administración aislada de dichos fármacos.
3. Los factores de crecimiento HGF, IGF-2, PDGF-BB, VEGF, FGF_b y EGF estimulan la actividad proliferativa de las células S4MH.
4. La presencia de los factores de crecimiento HGF, IGF-2, PDGF-BB, VEGF, FGF_b y EGF disminuye la eficacia antitumoral de los fármacos ACD, VCR y melfalán en las células S4MH.
5. El tratamiento con ATRA reduce el efecto inductor de la proliferación ejercido por los factores de crecimiento sobre la línea S4MH.
6. El ATRA mejora la eficacia antitumoral de la ACD, VCR y melfalán en la línea S4MH a través, entre otros posibles mecanismos, de la inhibición del estímulo proliferativo ejercido por los factores de crecimiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

Abounader R, Laterra J. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumour growth and angiogenesis. *Neuro-oncology* 2005; 7: 436-51.

Admiraal R, van der Paardt M, Kobes J, Kremer LC, Bisogno G, Merks JH. High-dose chemotherapy for children and young adults with stage IV rhabdomyosarcoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 8 (12): CD006669.

Alam A, Herault JP, Barron P, Favier B, Fons P, Delesque-Touchard N, Senegas I, Laboudie P, Bonnin J, Cassan C, Savi P, Ruggeri B, Carmeliet P, Bono F, Herbert JM. Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 909-15.

Alique M, Herrero JF, Lucio-Cazana FJ. All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1/2. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 1.

Alique M, Lucio FJ, Herrero JF. Vitamin A active metabolite, all-trans retinoic acid, induces spinal cord sensitization. II. Effects after intrathecal administration. *Br J Pharmacol* 2006; 149(1): 65-72.

Alique M, Moreno V, Kitamura M, Xu Q, Lucio-Cazana FJ. Kinase-dependent, retinoic acid receptor-independent up-regulation of cyclooxygenase-2 by all-trans retinoic acid in human mesangial cells. *Br J Pharmacol* 2006; 149(2): 215-25.

Allen CE, Flores R, Rauch R, Dauser R, Murray JC, Puccetti D, Hsu DA, Sondel P, Hetherington M, Goldman S, McClain KL. Neurodegenerative central nervous system Langerhans cell histiocytosis and coincident hydrocephalus treated with vincristine/cytosine arabinoside. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54(3): 416-23.

VII. Bibliografía

Alonso A, García-Alonso I, Portugal V, San Emeterio E, Méndez J, López de Tejada I. Desarrollo de un modelo experimental para el estudio de metástasis hepáticas. *Rev Esp Enf Digest* 1994; 86(1): 521-5.

Alonso-Varona A, Palomares T, Bilbao P, Castro B, Calle Y, Barberá Guillem E. Tumor-host interaction in non-random metastatic pattern distribution. *Bull Cancer* 1996; 83: 27-38.

Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(4): 1809-13.

Aoki M, Ogihara T, Morishita R. HGF as a key molecule in cardiovascular diseases. *Nippon Rinsho* 2001; 59(12): 2460-9.

Aragon-Ching JB, Dahut WL. VEGF inhibitors and prostate cancer therapy. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2(2): 161-8.

Aragon-Ching JB, Ning YM, Dahut WL. Acute aortic dissection in a hypertensive patient with prostate cancer undergoing chemotherapy containing bevacizumab. *Acta Oncol* 2008; 47(8): 1600-1.

Arndt CA, Donaldson SS, Anderson JR *et al*. What constitutes optimal therapy for patients with rhabdomyosarcoma of the female genital tract? *Cancer* 2001; 91: 2454-68.

Arndt CA, Hawkins DS, Meyer WH, Sencer SF, Neglia JP, Anderson JR. Comparison of results of a pilot study of alternating vincristine/doxorubicin/cyclophosphamide and etoposide/ifosfamide with IRS-IV in intermediate risk rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50 (1): 33-6.

Arndt CA, Rose PS, Folpe AL, Laack NN. Common Musculoskeletal Tumors of Childhood and Adolescence. *Mayo Clin Proc* 2012 May; 87(5): 475–87.

Ayalon D, Glaser T, Werner H. Transcriptional regulation of IGF-1 receptor gene expression by the PAX3-FKHR oncoprotein. *Growth Horm IGF Res* 2001; 11(5): 289-97.

B

Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, Glatfelter AA, Duray PH, Meltzer PS. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 2005; 65 (20): 9226-35.

Balbay MD, Pettaway CA, Kuniyasu H, Inoue K, Ramirez E, Li E, Fidler IJ, Dinney CP. Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999; 5(4): 783-9.

Barbera Guillem E, Alonso-Varona A, Vidal-Vanaclocha F. Selective implantation and growth of experimental liver metastasis in acinar zone one. *Cancer Res* 1989; 49: 4003-10.

Bardella C, Dettori D, Olivero M, Coltella N, Mazzone M, Di Renzo MF. The therapeutic potential of hepatocyte growth factor to sensitize ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel in vivo. *Clin Cancer Res* 2007; 13(7):2191-8.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87(8): 3336-43.

Barlow JW, Wiley JC, Mous M, Narendran A, Gee MF, Goldberg M, Sexsmith E, Malkin D. Differentiation of rhabdomyosarcoma Cell lines using retinoic acid. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47(6): 773-84.

Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2001; 20: 5736-46.

Barr S, Thomson S, Buck E, Russo S, Petti F, Sujka-Kwok I, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Gibson NW, Miglarese M, Epstein D, Iwata KK, Haley JD. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25(6): 685-93.

Barr, FG, Smith LM, Lynch JC, Strezelecki D, Parham MD, Qualman SJ, Breitfeld PP. Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the intergroup rhabdomyosarcoma study-III trial. A report from the children's oncology group. *J Mol Diag* 2006; 8: 202-8.

Bartella V, De Marco P, Malaguarnera R, Belfiore A, Maggiolini M. New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer. *Cell Signal* 2012; 24(8): 1515-21.

Basu A, Datta D, Zurakowski D, Pal S. Altered VEGF mRNA stability following treatments with immunosuppressive agents: implications for cancer development. *J Biol Chem* 2010; 285(33): 25196-202.

Bauer TW, Fan F, Liu W, Johnson M, Parikh NU, Parry GC, Callahan J, Mazar AP, Gallick GE, Ellis LM. Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor. *Ann Surg* 2005; 241(5): 748-68.

Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, Somcio RJ, Bucana CD, Callahan J, Parry GC, Evans DB, Boyd DD, Mazar AP, Ellis LM. Targeting of urokinase plasminogen activator receptor in human pancreatic carcinoma cells inhibits c-Met- and insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion and orthotopic tumor growth in mice. *Cancer Res* 2005; 65(17): 7775-81.

Baxter RC, Martin JL. Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulinlike growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 1986; 78(6): 1504-12.

Bayani J, Thorner P, Zielenska M, Pandita A, Beatty B, Squire JA. Application of a simplified comparative genomic hybridization technique to screen for gene amplification in pediatric solid tumors. *Pediatr Pathol Lab Med* 1995; 15(6): 831-44.

Bellus, GA. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat Genet* 1995; 10: 357-9.

Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(16): 8761-6.

Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin C.H., Alitalo K., Eriksson U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5): 512-6.

Berner JM, Forus A, Elkahouloun A, Meltzer PS, Fodstad O, Myklebost O. Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17(4): 254-9.

VII. Bibliografía

Bessa SS, Hussein TA, Morad MA, Amer AM. Urinary platelet-derived growth factor-BB as an early marker of nephropathy in patients with type 2 diabetes: an Egyptian study. *Ren Fail* 2012; 34(6): 670-5.

Bilbao P., Del Olmo M., Alonso-Varona A., Castro B., Palomares T. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate reverses the tumour growth-promoting effect of interleukin-2 and improves the anti-tumour efficacy of biochemotherapy in mice bearing B16F10 melanoma liver metastases. *Melanoma Research* 2002; 12: 17-26.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mo Cell Biol* 2003; 4(12): 915-25.

Blandford MC, Barr FG, Lynch JC, Randall RL, Qualman SJ, Keller C. Rhabdomyosarcomas utilize developmental, myogenic growth factors for disease advantage: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46(3): 329-38.

Board R, Jayson GC. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics. *Drug Resist Updat* 2005; 8(1-2): 75-83.

Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10608-13.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-Oncogene product. *Science* 1991; 251(4995): 802-4.

Boucher P, Gotthardt M. LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(2): 55-60.

Bowers DC, Fan S, Walter KA, Abounader R, Williams JA, Rosen EM, Laterra J. Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathways. *Cancer Res* 2000; 60(15): 4277-83.

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114(2): 521-32.

Breitfeld PP, Lyden E, Raney RB, Teot LA, Wharam M, Lobe T, Crist WM, Maurer HM, Donaldson SS, Ruymann FB. Ifosfamide and etoposide are superior to vincristine and melphalan for pediatric metastatic rhabdomyosarcoma when administered with irradiation and combination chemotherapy: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001; 23 (4): 225-33.

Breitfeld PP, Meyer WH. Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity. *Oncologist* 2005; 10: 518-27.

Breneman JC, Lyden E, Pappo AS, *et al.*: Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J Clin Oncol* 2003; 21(1): 78-84.

Brennan M, Alektiar KM, Maki R. Sarcomas of soft tissue and bone: soft tissue sarcoma. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, PA: Williams and Wilkins; 2001; 1841–91.

Bridge JA, Liu J, Weibolt V, *et al.* Novel genomics imbalance in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridisation: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes Chromosome Cancer* 2000; 27: 337-44.

Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18 (7): 855-62.

Bushue N, Wan YJ. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62 (13): 1285-98.

C

Cai C, Portnoy DC, Wang H, Jiang X, Chen S, Balk SP. Androgen receptor expression in prostate cancer cells is suppressed by activation of epidermal growth factor receptor and ErbB2. *Cancer Res* 2009; 69(12): 5202-9.

Calle Y, Palomares T, Castro B, del Olmo M, Alonso-Varona A. Removal of N-glycans from cell surface proteins induces apoptosis by reducing intracellular glutathione levels in the rhabdomyosarcoma cell line S4MH. *Biol Cell* 2000; 92(8-9): 639-46.

Calle Y, Palomares T, Castro B, del Olmo M, Bilbao P, Alonso-Varona A. Tunicamycin treatment reduces intracellular glutathione levels: effect on the metastatic potential of the rhabdomyosarcoma cell line S4MH. *Chemotherapy* 2000; 46(6): 408-28.

Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumour activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7443-8.

Cao L, Yu Y, Darko I, Currier D, Mayeenuddin LH, Wan X, Khanna C, Helman LJ. Addition to elevated insulin-like growth factor I receptor and initial modulation of the AKT pathway define the responsiveness of rhabdomyosarcoma to the targeting antibody. *Cancer Res* 2008; 68(19): 8039-48.

Cao L, Yu Y, Bilke S, Walker RL, Mayeenuddin LH, Azorsa DO, Yang F, Pineda M, Helman LJ, Meltzer PS. Genome-wide identification of PAX3-FKHR binding sites in rhabdomyosarcoma reveals candidate target genes important for development and cancer. *Cancer Res* 2010; 70(16): 6497-508.

Capoluongo E. Insulin-like growth factor system and sporadic malignant melanoma. *Am J Pathol* 2011; 178(1): 26-31.

Caramés J, Palomares T, Alonso-Varona A, Castro B, García-Alonso I. All-trans Retinoic Acid reduces the number of liver metastases following inoculation of S4MH rhabdomyosarcoma cells into the spleen. 36th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Santiago (España), 2001.

Carli M, Colombatti R, Oberlin O. High-dose melphalan with autologous stem-Cell rescue in metastatic rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2796-803.

Carpenter G, King L Jr, Cohen S. Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 Cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1979; 254(11): 4884-91.

Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 881-914.

Carroll RE, Goodlad RA, Poole AJ, Tyner AL, Robey RB, Swanson SM, Unterman TG. Reduced susceptibility to azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and colon cancer in growth hormone deficient rats. *Growth Horm IGF Res* 2009; 19(5): 447-56.

Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA, Phipps J, Yen L, Batist G. Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and

chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47(2): 126-32.

Casanova M, Ferrari A, Bisogno G. Vinorelbine and low-dose cyclophosphamide in the treatment of pediatric sarcomas: pilot study for the upcoming European Rhabdomyosarcoma Protocol. *Cancer* 2004; 101(7): 1664-71.

Casanova M, Ferrari A, Spreafico F, *et al.*: Vinorelbine in previously treated advanced childhood sarcomas: evidence of activity in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 2002; 94 (12): 3263-8.

Castro B, Alonso-Varona A, del Olmo M, Bilbao P, Palomares T. Role of gamma-glutamyltranspeptidase on the response of poorly and moderately differentiated rhabdomyosarcoma cell lines to buthionine sulfoximine-induced inhibition of glutathione synthesis. *Anticancer Drugs* 2002; 13(3): 281-91.

Chan SY, Wong RW. Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J Biol Chem* 2000; 275(49): 38693-8.

Chao W, D'Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19(2): 111-20.

Chattopadhyay N, Butters RR, Brown EM, Agonist of the retinoic acid and retinoic X-receptors inhibit hepatocyte growth factor secretion and expression in U87 human astrocytoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 87: 100-8.

Chau I, Cunningham D, Hickish T, Massey A, Higgins L, Osborne R, Botwood N, Swaisland A. Gefitinib and irinotecan in patients with fluoropyrimidine-refractory, irinotecan-naïve advanced colorectal cancer: a phase I-II study. *Ann Oncol* 2007; 18(4): 730-7.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001; 294(5548): 1866-70.

Chen JT, Huang CY, Chiang YY, Chen WH, Chiou SH, Chen CY, Chow KC. HGF increases cisplatin resistance via down-regulation of AIF in lung cancer cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38(5): 559-65.

Chen YC, Chang CN, Hsu HC, Chiou SJ, Lee LT, Hseu TH. Sennoside B inhibits PDGF receptor signaling and Cell proliferation induced by PDGF-BB in human osteosarcoma cells. *Life Sci* 2009; 84(25-26): 915-22.

Cheng B, Maffi SK, Martinez AA, Acosta YP, Morales LD, Roberts JL. Insulin-like growth factor-I mediates neuroprotection in proteasome inhibition-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Mol Cell Neurosci* 2011; 47(3): 181-90.

Chisholm JC, Marandet J, Rey A, Scopinaro M, de Toledo JS, Merks JH, O'Meara A, Stevens MC, Oberlin O. Prognostic factors after relapse in nonmetastatic rhabdomyosarcoma: a nomogram to better define patients who can be salvaged with further therapy. *J Clin Oncol*. 2011; 29 (10): 1319-25.

Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007; 25(7): 884-96.

Christensen JG; Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB. A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumour activity in vivo. *Cancer Res* 2003; 63: 7345-55.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962; 237: 1555-62.

Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 94-109.

Crist W, Gehan EA, Ragab AH. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol* 1995; 13 (3): 610-30.

Crist WM, Garnsey L, Beltangady MS. Prognosis in children with rhabdomyosarcoma: a report of the intergroup rhabdomyosarcoma studies I and II. Intergroup Rhabdomyosarcoma Committee. *J Clin Oncol* 1990; 8 (3): 443-52.

Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, Breneman J, Qualman SJ, Wiener E, Wharam M, Lobe T, Webber B, Maurer HM, Donaldson SS. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* 2001 15; 19 (12): 3091-102.

Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 472-8.

Cronauer MV, Nessler-Menardi C, Klocker H, Maly K, Hobisch A, Bartsch G, Culig Z. Androgen receptor protein is down-regulated by basic fibroblast growth factor in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2000; 82(1): 39-45.

Cronauer MV, Hittmair A, Eder IE, Hobisch A, Culig Z, Ramoner R, Zhang J, Bartsch G, Reissigl A, Radmayr C, Thurnher M, Klocker H. Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate* 1997; 31(4): 223-33.

Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, Ackermann R, Burchardt M. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol* 2003; 43(3): 309-19.

Croze LE, Linardic CM. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets in rhabdomyosarcoma. *Sarcoma* 2011; 756982.

D

Dai Y, Wang J, Xia J, Hong Y, Chen N, Cheng B. Genome-wide transcriptional profiling analysis of *all trans* retinoic acid-treated tongue carcinoma SCC-9 cells. *J Surg Oncol* 2011; 104(7): 830-5.

Dantonello TM, Int-Veen C, Winkler P, Leuschner I, Schuck A, Schmidt BF, Lochbuehler H, Kirsch S, Hallmen E, Veit-Friedrich I, Bielack SS, Niggli F, Kazanowska B, Ladenstein R, Wiebe T, Klingebiel T, Treuner J, Koscielniak E. Initial patient characteristics can predict pattern and risk of relapse in localized rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2008; 26 (3): 406-13.

Daruwalla J, Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C. Effect of thalidomide on colorectal cancer liver metastases in CBA mice. *J Surg Oncol* 2005; 91(2): 134-40.

Daughaday WH, Kapadia M. Significance of abnormal serum binding of insulin-like growth factor II in the development of hypoglycemia in patients with non-islet-Cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(17): 6778-82.

Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD Jr, van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 1972; 235(5333): 107.

Davicioni, E., *et al.* Identification of a PAXFKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 2006; 66: 6936–46.

De Corti F, Bisogno G, Dall'Igna P, Ferrari A, Buffa P, De Paoli A, Cecchetto G. Does surgery have a role in the treatment of local relapses of non-metastatic rhabdomyosarcoma? *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57 (7): 1261-5.

de Jonge HJ, Weidenaar AC, Ter Elst A, Boezen HM, Scherpen FJ, Bouma-Ter Steege JC, Kaspers GJ, Goemans BF, Creutzig U, Zimmermann M, Kamps WA, de Bont ES. Endogenous vascular endothelial growth factor-C expression is associated with decreased drug responsiveness in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2008; 14(3): 924-30.

De Luján M, Cerliane JP, Monti J, Carnovale C, Ronco MT, Pisan G, Lugano MC, Carrillo MC. The in vivo apoptotic effect of interferon alfa-2b on rat preneoplastic liver involves bax protein. *Hepatology* 2002; 35: 824-33.

De Marco P, Bartella V, Vivacqua A, Lappano R, Santolla MF, Morcavallo A, Pezzi V, Belfiore A, Maggiolini M. Insulin-like growth factor-I regulates GPER expression and function in cancer cells. *Oncogene* 2013; 32(6): 678-88.

De Sio L, Milano GM, Castellano A, Jenkner A, Fidani P, Dominici C, Donfrancesco A. Gemcitabine and docetaxel (GEMDOX) for the treatment of relapsed and refractory pediatric sarcomas. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47(1): 30-6.

del Olmo M., Alonso-Varona A., Castro B., Calle Y., Bilbao P., Palomares T. Effects of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate on the cytotoxic activity and toxicity of cyclophosphamide in mice bearing B16F10 melanoma liver metastases. *Melanoma Research* 2000; 10: 103-12.

Delehedde M, Sergeant N, Lyon M, Rudland PS, Fernig DG. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of rat mammary fibroblasts through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. *Eur J Biochem* 2001; 268(16): 4423-9.

Deuel T.F., Huang J.S., Proffitt R.T., Baenziger J.U., Chang D., Kennedy B.B. Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. *J Biol Chem* 1981; 256(17): 8896-9.

Deuel T.F., Senior R.M., Chang D., Griffin G.L., Heinrikson R.L., Kaiser E.T. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(7): 4584-7.

Dhandapani L, Yue P, Ramalingam SS, Khuri FR, Sun SY. Retinoic acid enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells by upregulating TRAIL receptor 1 expression. *Cancer Res* 2011; 71(15): 5245-54.

Di Francesco AM, Ubezio P, Torella AR, Meco D, Pierri F, Barone G, Cusano G, Pisano C, D'Incalci M, Riccardi R. Enhanced Cell cycle perturbation and apoptosis mediate the synergistic effects of ST1926 and ATRA in neuroblastoma preclinical models. *Invest New Drugs* 2012; 30(4): 1319-30.

Dias P, Dilling M, Houghton P. The molecular basis of skeletal muscle differentiation. *Semin Diagn Pathol* 1994; 11(1): 3-14.

Dinney CP, Tanguay S, Bucana CD, Eve BY, Fidler IJ. Intravesical liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine treatment of human bladder carcinoma growing in nude mice. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15(6): 585-92.

Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, Claesson-Welsh L. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3

VII. Bibliografía

(VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003; 278(42): 40973-9.

Donaldson SS, Anderson JR. Rhabdomyosarcoma: many similarities, a few philosophical differences. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (12): 2586-7.

Dong J, Wiley HS. Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. *J Biol Chem* 2000; 275(1): 557-64.

Donovan EA, Kummar S. Role of insulin-like growth factor-1R system in colorectal carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66(2): 91-8.

Droller MJ. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *J Urol* 1998; 160(5): 1932.

Duester G. Keeping an eye on retinoic acid signaling during eye development. *Chem Biol Interact* 2009; 178(1-3): 178-81.

Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008; 134(6): 921-31.

Dumont SN, Lazar AJ, Bridge JA, Benjamin RS, Trent JC. PAX3/7-FOXO1 fusion status in older rhabdomyosarcoma patient population by fluorescent in situ hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138 (2): 213-20.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Jour Clin Oncol* 2002; 20(21): 4368-80.

E

Eichenmüller M, Hemmerlein B, von Schweinitz D, Kappler R. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer* 2010; 103(1): 43-51.

El-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ* 1990; 1(7): 325-31.

Elkahloun AG, Bittner M, Hoskins K, Gemmill R, Meltzer PS. Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17(4): 205-14.

Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I, Vlodavsky I. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB J* 2001; 15(9): 1661-3.

Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J, Lam PY, Maas RL. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(9): 4213-8.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(2): 139-49.

F

Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, Pruschy M, Csermak K, Man A, Campochiaro P, Wood J, O'Reilly T, Meyer T. PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer Drug Des* 2000; 15(1): 17-28.

VII. Bibliografía

Fan S, Ma YX, Gao M, Yuan RQ, Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM. The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for Cell survival and ADN repair. *Mol Cell Biol* 2001; 21(15): 4968-84.

Fausto, N. Liver regeneration. *Journal of Hepatology* 2000, 32 (1 Suppl): 19-31.

Felix CA, Kappel CC, Mitsudomi T, Nau MM, Tsokos M, Crouch GD, Nisen PD, Winick NJ, Helman LJ. Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1992; 52(8): 2243-7.

Ferns GA, Sprugel KH, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Kelly JD, Murray M, Raines EW, Ross R. Relative platelet-derived growth factor receptor subunit expression determines Cell migration to different dimeric forms of PDGF. *Growth Factors* 1990; 3(4): 315-24.

Ferracini R, Olivero M, Di Renzo MF, Martano M, De Giovanni C, Nanni P, Basso G, Scotlandi K, Lollini PL, Comoglio PM. Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. *Oncogene* 1996; 12(8): 1697-705.

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998; 4(3): 336-40.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2): 851-8.

Ferrara N, van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 1999; 104(11): 1613-20.

Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77(7): 527-43.

Ferrari A, Casanova M, Collini P. Adult-type soft tissue sarcomas in pediatric-age patients: experience at the Istituto Nazionale Tumori in Milan. *J Clin Oncol* 2005; 23(18): 4021-30.

Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002; 23(6): 824-54.

Fisher GJ, Datta S, Wang Z, Li XY, Quan T, Chung JH, Kang S, Voorhees JJ. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J Clin Invest* 2000; 106(5): 663-70.

Fletcher JA. Molecular biology and cytogenetics of soft tissue sarcomas: relevance and targeted therapies. *Cancer Treat Res* 2004; 120: 99-116.

Folkman J. Angiogenesis and proteins of the hemostatic system. *J Thromb Haemost* 2003; 1(8): 1681-2.

Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59(1): 99-106.

VII. Bibliografía

Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999; 19(5): 3278-88.

Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandes R, Doucette S, Cooley K, Seely A, Sagar S, Wong R, Seely D. Vitamin A and retinoid derivatives for lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PLoS One*. 2011; 6 (6): e21107.

Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR, Kocher HM. Retinoic acid-induced pancreatic stellate Cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 2011; 141(4): 1486-97.

Froesch ER, Buergi H, Rameseier EB, Bally P, Labhart A. Antibody-suppressible and non suppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest* 1963; 42: 1816-34.

Fukasawa M, Matsushita A, Korc M. Neuropilin-1 interacts with integrin β 1 and modulates pancreatic cancer Cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(8): 1173-80.

Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38205-11.

Furlong RA, Takehara T, Taylor WG, Nakamura T, Rubin JS. Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J Cell Sci* 1991; 100 (1): 173-7.

G

Gallagher EJ, LeRoith D. Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* 2011; 152(7): 2546-51.

Gallego S, Lloret A, Roma J, Sabado C, Gros L, de Toledo JS. Detection of bone marrow micrometastasis and microcirculating disease in rhabdomyosarcoma by a real-time RT-PCR assay. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132(6): 356-62.

Gao CF, Vande Woude GF. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res* 2005; 15(1): 49-51.

Garattini E, Gianni M, Terao M. Retinoid related molecules an emerging class of apoptotic agents with promising therapeutic potential in oncology: pharmacological activity and mechanisms of action. *Curr Pharm Design* 2004; 10(4): 433-48.

Garson JA, Clayton J, McIntyre P, Kemshead JT. N-myc *Oncogene* amplification in rhabdomyosarcoma at release. *Lancet* 1986; 1(8496): 1496.

Geva E, Jaffe RB. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55(8): 511-9.

Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74(3): 429-38.

Giese NA, Robbins KC, Aaronson SA. The role of individual cysteine residues in the structure and function of the v-sis gene product. *Science* 1987; 5: 236(4806): 1315-8.

Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Hofstrand PD, Gao Z, Shoemaker K, Bukowski TR, Moore M, Feldhaus AL, Humes JM, Palmer TE, Hart CE.

Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem* 2001; 276(29): 27406-14.

Giusti RM, Shastri K, Pilaro AM, Fuchs C, Cordoba-Rodriguez R, Koti K, Rothmann M, Men AY, Zhao H, Hughes M, Keegan P, Weiss KD, Pazdur R. U.S. Food and Drug Administration approval: panitumumab for epidermal growth factor receptor-expressing metastatic colorectal carcinoma with progression following fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-containing chemotherapy regimens. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): 1296-302.

Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments. *Head Neck Oncol* 2010; 2: 8.

Gómez-Vidal JA, Campos J, Marchal JA, Boulaiz H, Gallo MA, Carrillo E, Espinosa A, Aránega A. Actual targets in cytodifferentiation cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2004; 4(2): 175-202.

Gordon T, McManus A, Anderson J, Min T, Swansbury J, Pritchard-Jones K, Shipley J. Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36(2): 259-67.

Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(6): 2295-9.

Granger RL, Hughes TR, Ramji DP. Gene, stimulus and cell-type specific regulation of activator protein-1 in mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1492(1): 100-7.

Gregory H, Willshire IR. The isolation of the urogastrones - inhibitors of gastric acid secretion - from human urine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1975; 356(11): 1765-74.

Gregory H. In vivo aspects of urogastrone-epidermal growth factor. *J Cell Sci Suppl* 1985; 3: 11-7.

Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 1975; 25: 257(5524): 325-7.

Guérin E, Ludwig MG, Basset P, Anglard P. Stromelysin-3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid. Therapeutical implication of receptor-selective retinoids dissociating transactivation and AP-1-mediated transrepression. *J Biol Chem* 1997; 272(17): 11088-95.

Gui SY, Chen FH, Zhou Q, Wang Y. Effects of novel all-trans retinoic acid retinamide derivatives on the proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma Cell line A549 cells. *Yakugaku Zasshi* 2011; 131(10): 1465-72.

H

Hameed DA, el-Metwally TH. The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: impact on recurrence, survival and TGFalpha and VEGF as end-point biomarkers. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(1): 92-100.

Han S, Fukazawa T, Yamatsuji T, Matsuoka J, Miyachi H, Maeda Y, Durbin M, Naomoto Y. Anti-tumor effect in human lung cancer by a combination treatment of novel histone deacetylase inhibitors: SL142 or SL325 and retinoic acids. *PLoS One* 2010; 5(11): e13834.

Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJ, Salomon DS, Strizzi L. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15 (2): 191-9.

Hayes-Jordan A, Andrassy R. Rhabdomyosarcoma in children. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 373-8.

Hbib AT, Lagorce C, Wind P, Spano JP, Des Guetz G, Milano G, Benamouzig R, Rixe O, Morere JF, Breau JL, Martin A, Fagard R. Identification of a functional EGF-R/p60c-src/STAT3 pathway in colorectal carcinoma: analysis of its long-term prognostic value. *Cancer Biomark* 2008; 4(2): 83-91.

Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003; 21(23): 4342-9.

Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 1985; 39(3): 169-87.

Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(8): 3722-6.

Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1990; 1(8): 555-66.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79(4): 1283-316.

Heldin CH. Autocrine PDGF stimulation in malignancies. *Ups J Med Sci* 2012; 117(2): 83-91.

Hennequin LF, Stokes ES, Thomas AP, Johnstone C, Plé PA, Ogilvie DJ, Dukes M, Wedge SR, Kendrew J, Curwen JO. Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45(6): 1300-12.

Hennequin LF, Thomas AP, Johnstone C, Stokes ES, Plé PA, Lohmann JJ, Ogilvie DJ, Dukes M, Wedge SR, Curwen JO, Kendrew J, Lambert-van der Brempt C. Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 1999; 42(26): 5369-89.

Hernandez RE, Putzke AP, Myers JP, Margaretha L, Moens CB. Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development* 2007; 134(1): 177-87.

Herrmann D, Seitz G, Warmann SW, Bonin M, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S. Cetuximab promotes immunotoxicity against rhabdomyosarcoma in vitro. *J Immunother* 2010; 33(3): 279-86.

Hess C, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D, Glanzmann C, Bodis S, Pruschy M. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer* 2001; 85(12): 2010-6.

Heymach JV, Desai J, Manola J, Davis DW, McConkey DJ, Harmon D, Ryan DP, Goss G, Quigley T, Van den Abbeele AD, Silverman SG, Connors S, Folkman J, Fletcher CD, Demetri GD. Phase II study of the antiangiogenic agent SU5416 in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10(17): 5732-40.

Hiro J, Inoue Y, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M. Mechanism of resistance to chemoradiation in p53 mutant human colon cancer. *Int J Oncol* 2008; 32(6): 1305-10.

Hirotsu M, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, Komiya S. Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells. *Br J Cancer* 2009; 101(12): 2030-7.

VII. Bibliografía

Hishiki T, Saito T, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Matsuura G, Saito E, Shibata R, Mise N, Yokoyama Y, Yoshida H. Src kinase family inhibitor PP2 induces aggregation and detachment of neuroblastoma cells and inhibits Cell growth in a PI3 kinase/Akt pathway-independent manner. *Pediatr Surg Int* 2011; 27(2): 225-30.

Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development* 2003; 130(20): 4769-84.

Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hägerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, Welsh M. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* 2004; 279(21): 22267-75.

Hoogendorn PC, Collin F, Daugaard S, Dei Tos AP, Fisher C, Schneider U, Scito R. Pathology and Biology Subcommittee of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Groups. Changing concepts in the pathological basis of soft tissue and bone sarcoma treatments. *Eur J Cancer* 2004; 40: 644-54.

Houghton PJ, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Keir ST, Reynolds CP, Kang MH, Maris JM, Wu J, Smith MA. Initial testing of a monoclonal antibody (IMC-A12) against IGF-1R by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54(7): 921-6.

Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, *et al.*: Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50 (4): 799-805.

Hudson LG, Moss NM, Stack MS. EGF-receptor regulation of matrix metalloproteinases in epithelial ovarian carcinoma. *Future Oncol* 2009; 5(3): 323-38.

Husvik C, Bryne M, Halstensen TS. c-Jun N-terminal kinase negatively regulates epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Oral Sci* 2009; 117(6): 663-8.

Husvik C, Bryne M, Halstensen TS. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression in oral squamous Cell carcinoma Cell lines is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 but is Src and nuclear factor-kappa B independent. *Eur J Oral Sci* 2009; 117(5): 528-35.

Huynh H, Ngo VC, Choo SP, Poon D, Koong HN, Thng CH, Toh HC, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Song IC, Chang AP, Ong HS, Chung AY, Chow PK, Soo KC. Sunitinib (SUTENT, SU11248) suppresses tumor growth and induces apoptosis in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9(6): 738-47.

Hyder SM, Liang Y, Wu J, Welbern V. Regulation of thrombospondin-1 by natural and synthetic progestins in human breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(3): 809-17.

Hynes NE. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets in cancer. *Discov Med* 2005; 5(29): 483-8.

I

Ichimura T, Maier JA, Maciag T, Zhang G, Stevens JL. FGF-1 in normal and regenerating kidney: expression in mononuclear, interstitial, and regenerating epithelial cells. *Am J Physiol* 1995; 269(5 Pt 2): F653-62.

Iolascon A, Faienza MF, Coppola B, Rosolen A, Basso G, Della Ragione F, Schettini F. Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15(4): 217-22.

Iwamoto R, Handa K, Mekada E. Contact-dependent growth inhibition and apoptosis of epidermal growth factor (EGF) receptor-expressing cells by the membrane-anchored form of heparin-binding EGF-like growth factor. *J Biol Chem* 1999; 274(36): 25906-12.

Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11(4): 335-44.

J

Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW, Chang A, Zhang C, Patterson C, Lee DC. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J* 2003; 22(11): 2704-16.

Jakacki RI, Hamilton M, Gilbertson RJ, Blaney SM, Tersak J, Krailo MD, Ingle AM, Voss SD, Dancey JE, Adamson PC. Pediatric phase I and pharmacokinetic study of erlotinib followed by the combination of erlotinib and temozolomide: a Children's Oncology Group Phase I Consortium Study. *J Clin Oncol* 2008; 26(30): 4921-7.

Jankowski K, Kucia M, Wysoczynski M, Reca R, Zhao D, Trzyna E, Trent J, Peiper S, Zembala M, Ratajczak J, Houghton P, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7926-35.

Jansing R, Samsonoff WA. Effect of epidermal growth factor on cultured adult rat hepatocytes. *Tissue Cell* 1984; 16(2): 157-66.

Jeffers M, Rong S, Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med (Berl)* 1996; 74(9): 505-13.

Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e003.

Jiang WG, Hallet MB, Puntis MCA. Hepatocyte growth factor/Scatter factor, liver regeneration and cancer metastasis. *Br Jour Surg* 1993; 80: 1368-73.

Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor , its receptor and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Haematol* 2005; 53: 35-69.

Jie JZ, Wang JW, Qu JG, Hung T. Suppression of human colon tumor growth by adenoviral vector-mediated NK4 expression in an athymic mouse model. *World J Gastroenterol* 2007; 13(13): 1938-46.

Jiménez-Lara AM, Clarke N, Altucci L, Gronemeyer H. Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Trends Mol Med* 2004; 10(10): 508-15.

Jin H, Yang R, Zheng Z, Romero M, Ross J, Bou-Reslan H, Carano RA, Kasman I, Mai E, Young J, Zha J, Zhang Z, Ross S, Schwall R, Colbern G, Merchant M. MetMAB, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumour growth and improves survival. *Cancer Res* 2008; 68: 4360-8.

Jost LM, Gschwind HP, Jalava T, Wang Y, Guenther C, Souppart C, Rottmann A, Denner K, Waldmeier F, Gross G, Masson E, Laurent D. Metabolism and disposition of vatalanib (PTK787/ZK-222584) in cancer patients. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(11): 1817-28.

K

Kaminski WE, Lindahl P, Lin NL, Broudy VC, Crosby JR, Hellström M, Swolin B, Bowen-Pope DF, Martin PJ, Ross R, Betsholtz C, Raines EW. Basis of hematopoietic

defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF beta-receptor null mice. *Blood* 2001; 97(7): 1990-8.

Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AO. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 472–86.

Kang MH, Smith MA, Morton CL, Keshelava N, Houghton PJ, Reynolds CP. National Cancer Institute pediatric preclinical testing program: model description for in vitro cytotoxicity testing. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56(2):239-49.

Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* 1979; 53(6): 1043-52.

Karabulut B, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Sezgin C, Uslu R. Regulation of apoptosis-related molecules by synergistic combination of all-trans retinoic acid and zoledronic acid in hormone-refractory prostate cancer cell lines. *Mol Biol Rep* 2011; 38(1):249-59.

Karabulut B, Karaca B, Varol U, Muslu U, Cakar B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R. Enhancing cytotoxic and apoptotic effect in OVCAR-3 and MDAH-2774 cells with all-trans retinoic acid and zoledronic acid: a paradigm of synergistic molecular targeting treatment for ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 102-11.

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 2007; 315(5813): 820-5.

Kayton ML, Delgado R, Busam K, Cody HS 3rd, Athanasian EA, Coit D, La Quaglia MP. Experience with 31 sentinel lymph node biopsies for sarcomas and carcinomas in pediatric patients. *Cancer* 2008; 112 (9): 2052-9.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 8: 246(4935): 1309-12.

Khan J, Wei JS, Ringnér M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001; 7: 673–9.

Khanduja KL, Kumar S, Varma N, Varma SC, Avti PK, Pathak CM. Enhancement in alpha-tocopherol succinate-induced apoptosis by all-trans-retinoic acid in primary leukemic cells: role of antioxidant defense, Bax and c-myc. *Mol Cell Biochem* 2008; 319(1-2): 133-9.

Khatib ZA, Matsushima H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* 1993; 53(22): 5535-41.

Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Han JH, Kim K, Choi EC. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous Cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2006; 126(1): 88-94.

Kim NK, Kim HS, Suh CO, Kim HO, Lyu CJ. Clinical results of high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation in children with advanced stage rhabdomyosarcoma. *J Korean Med Sci.* 2012; 27(9): 1066-72.

VII. Bibliografía

Kitamura M, Toi M, Arai K, Iwasaki Y, Suzuki H, Matsuo K. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of gastric cancer patients. *Oncol Rep* 1998; 5(6): 1419-24.

Kiura K, Nakagawa K, Shinkai T, Eguchi K, Ohe Y, Yamamoto N, Tsuboi M, Yokota S, Seto T, Jiang H, Nishio K, Saijo N, Fukuoka M. A randomized, double-blind, phase IIa dose-finding study of Vandetanib (ZD6474) in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3(4): 386-93.

Kleiner-Hancock HE, Shi R, Remeika A, Robbins D, Prince M, Gill JN, Syed Z, Adegboyega P, Mathis JM, Clifford JL. Effects of ATRA combined with citrus and ginger-derived compounds in human SCC xenografts. *BMC Cancer* 2010; 10: 394.

Klemann C, Raveney BJ, Oki S, Yamamura T. Retinoid signals and Th17-mediated pathology. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2009; 32(1): 20-8.

Klüttermann K, Banning U, Kachel M, Krause C, Körholz D, Mauz-Körholz C. TRAIL-induced cytotoxicity in a melphalan-resistant rhabdomyosarcoma cell line via activation of caspase-2. *AntiCancer Res* 2006; 26(1): 351-6.

Konieczny SF, Drobos BL, Menke SL, Taparowsky EJ. Inhibition of myogenic differentiation by the H-ras oncogene is associated with the down regulation of the MyoD1 gene. *Oncogene* 1989; 4(4): 473-81.

Krzystek-Korpaczka M, Diakowska D, Gamian A, Matusiewicz M. Increase in serum platelet-derived growth factor (PDGF)-BB reflects lymph node involvement in esophageal cancer patients independently from platelet count. *Exp Oncol* 2011; 33(3): 140-4.

Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Keio J Med.* 2012; 61(2): 47-56.

Kuçi S, Rettinger E, Voss B, Weber G, Stais M, Kreyenberg H, Willasch A, Kuçi Z, Koscielniak E, Klöss S, von Laer D, Klingebiel T, Bader P. Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010; 95(9): 1579-86.

Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Mikami Y, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(9): 977-81.

Kuttesch JF Jr, Krailo MD, Madden T, Johansen M, Bleyer A; Children's Oncology Group. Phase II evaluation of intravenous vinorelbine (Navelbine) in recurrent or refractory pediatric malignancies: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(4): 590-3.

Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11(4): 709-24.

L

Lagha M, Kormish JD, Rocancourt D, Manceau M, Epstein JA, Zaret KS, Relaix F, Buckingham ME. Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program. *Genes Dev* 2008; 22:1828–37.

Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, Cherrington. SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res* 2000; 60(15): 4152-60.

VII. Bibliografía

Langston AW, Gudas LJ. Retinoic acid and homeobox gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4(4): 550-5.

LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, Sullivan C, Boldog FL, Yang M, Vernet C, Burgess CE, Fernandes E, Deegler LL, Rittman B, Shimkets J, Shimkets RA, Rothberg JM, Lichenstein HS. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5): 517-21.

Lashkari A, Chow WA, Valdes F, Leong L, Phan V, Twardowski P, Kapoor N, Molina A, Al-Kadhimi Z, Frankel P, Somlo G. Tandem high-dose chemotherapy followed by autologous transplantation in patients with locally advanced or metastatic sarcoma. *Anticancer Res* 2009; 29(8): 3281-8.

Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 1989; 58(5): 823-31.

Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-1 signaling pathway. *Curr Pharm Des* 2007; 13(7): 663-9.

Laviola L, Natalicchio A, Perrini S, Giorgino F. Abnormalities of IGF-1 signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain, and fetoplacental unit in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(5): E991-9.

Lawrence W Jr, Anderson JR, Gehan EA, Maurer H. Pretreatment TNM staging of childhood rhabdomyosarcoma: a report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. Children's Cancer Study Group. Pediatric Oncology Group. *Cancer* 1997; 80 (6): 1165-70.

Lawrence W Jr, Gehan EA, Hays DM, Beltangady M, Maurer HM. Prognostic significance of staging factors of the UICC staging system in childhood

rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-II). *J Clin Oncol* 1987; 5 (1): 46-54.

Lesko E, Majka M. The biological role of HGF-Met axis in tumour growth and development of metastasis. *Front Biosci* 2008; 13: 1271-80.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 8:246(4935): 1306-9.

Li M, Wang J, Ng SS, Chan CY, He ML, Yu F, Lai L, Shi C, Chen Y, Yew DT, Kung HF, Lin MC. Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. *Cancer* 2009; 115(21): 4959-72.

Li Qiao-xin, Liu Chun-xia, Chun Cai-pu, Qi Yan, Chang Bin, Li Xin-xia, Chen Yun-zhao, Nong Wei-xia, Li Hong-an y Li Feng. Chromosomal imbalances revealed in primary rhabdomyosarcomas by comparative genomic hybridization. *Chin Med J* 2009; 122(11): 1277-82.

Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 2(5): 302-9.

Liizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. Drug development against metastasis related genes and their pathways: a rationlae for cáncer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786(2): 87-104.

Lim JS, Park SH, Jang KL. All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412(3): 500-5.

VII. Bibliografía

Lin JD, Chao TC, Weng HF, Lin KD. The roles of cytokines and retinoic acid in the regulation of human thyroid cancer cell growth. *Cytokine* 1998; 10(7): 536-9.

Lin LM, Li BX, Xiao JB, Lin DH, Yang BF. Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11(36): 5633-7.

Liu L, Chen L, Luo Y, Chen W, Zhou H, Xu B, Han X, Shen T, Huang S. Rapamycin inhibits IGF-1 stimulated Cell motility through PP2A pathway. *PLOS One* 2010; 5(5): e10578.

Liu M, Xu de Q, Peng J, Zheng R, Li F, Jiang SW. cDNA cloning and characterization of 5' upstream promoter region of porcine mef2c gene. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(7): 4723-30.

Liu Y. Hepatocyte growth factor and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(1): 23-30.

Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab andvatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist* 2007; 12(4): 443-50.

Lu X, Kang Y. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. *Br J Cancer* 2010; 102(3): 457-61.

Lu XP, Fanjul A, Picard N, Pfahl M, Rungta D, Nared-Hood K, Carter B, Piedrafita J, Tang S, Fabbizio E, Pfahl M. Novel retinoid-related molecules as apoptosis inducers and effective inhibitors of human lung cancer cells in vivo. *Nature Med* 1997; 3(6): 686-90.

Lukasiewicz E, Miekus K, Kijowski J, Drabik G, Wilusz M, Bobis-Wozowicz S, Majka M. Inhibition of rhabdomyosarcoma's metastatic behavior through downregulation of MET receptor signaling. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(3): 485-9.

Lukasiewicz E, Miekus K, Kijowski J, Gozdzik J, Wilusz M, Bobis-Wozowicz S, Wiecha O, Majka M. High anti tumor activity against rhabdomyosarcoma cells and low normal cells cytotoxicity of heat shock protein 90 inhibitors, with special emphasis on 17-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-amino-17-demethoxygeldanamycin. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60(3): 161-6.

M

Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Ciccolini J, Formento JL, Tiffon C, Renée N, Marchetti S, Etienne MC, Milano G. ZD1839 (Iressa) modifies the activity of key enzymes linked to fluoropyrimidine activity: rational basis for a new combination therapy with capecitabine. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13): 4735-42.

Magné N, Chargari C, Castadot P, Ghalibafian M, Soria JC, Haie-Meder C, Bourhis J, Deutsch E. The efficacy and toxicity of EGFR in the settings of radiotherapy: Focus on published clinical trials. *Eur J Cancer* 2008; 44(15): 2133-43.

Manara MC, Landuzzi L, Nanni P, Nicoletti G, Zambelli D, Lollini PL, Nanni C, Hofmann F, García-Echeverría C, Picci P, Scotlandi K. Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(4): 1322-30.

Mansky PJ, Liewehr DJ, Steinberg SM, Chrousos GP, Avila NA, Long L, Bernstein D, Mackall CL, Hawkins DS, Helman LJ. Treatment of metastatic osteosarcoma with the somatostatin analog OncoLar: significant reduction of insulin-like growth factor-1 serum levels. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24(6): 440-6.

VII. Bibliografía

Marchbank T, Mahmood A, Harten S, Maxwell PH, Playford RJ. Dimethyloxalyglycine stimulates the early stages of gastrointestinal repair processes through VEGF-dependent mechanisms. *Lab Invest* 2011; 91(12): 1684-94.

Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* 2003; 4(1): 1-10.

Maroun CR, Naujokas MA, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Park M. The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosinekinase. *Mol Cell Biol* 2000; 20(22): 8513-25.

Martelli H, Oberlin O, Rey A, Godzinski J, Spicer RD, Bouvet N, Haie-Meder C, Terrier-Lacombe MJ, Sanchez de Toledo J, Spooner D, Sommelet D, Flamant F, Stevens MC. Conservative treatment for girls with nonmetastatic rhabdomyosarcoma of the genital tract: a report from the study committee of the international society of pediatric oncology. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2117-22.

Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 22: 95(26): 15809-14.

Martínez-Astorquiza T, Palomares T, Alonso-Varona A, San Cristóbal J, Cearra I, Méndez J, García-Alonso I. Ensayo de una triple terapia en el control del proceso metastático por rhabdomiosarcoma en la rata. Abstracts XIII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas. Barcelona. 2004.

Martins AS, Olmos D, Missiaglia E, Shipley J. Targeting the insulin-like growth factor pathway in rhabdomyosarcomas: rationale and future perspectives. *Sarcoma* 2011; 2011: 209736.

Mascarenhas L, Lyden ER, Breitfeld PP, Walterhouse DO, Donaldson SS, Paidas CN, Parham DM, Anderson JR, Meyer WH, Hawkins DS. Randomized phase II window trial of two schedules of irinotecan with vincristine in patients with first relapse or progression of rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (30): 4658-63.

Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(2): 157-70.

Mattke AC, Bailey EJ, Schuck A, Dantonello T, Leuschner I, Klingebiel T, Treuner J, Koscielniak E. Does the time-point of relapse influence outcome in pediatric rhabdomyosarcomas? *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52 (7): 772-6.

Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer* 2006; 119(3):477-83.

Mayeenuddin LH, Yu Y, Kang Z, Helman LJ, Cao L. Insulin-like growth factor 1 receptor antibody induces rhabdomyosarcoma cell death via a process involving AKT and Bcl-x(L). *Oncogene* 2010; 29(48): 6367-77.

Mazzeron JJ, Suit HD. Lymph nodes as sites of metastasis from sarcoma of soft tissue. *Cancer* 1987; 60: 1800-8.

Mazzoleni S, Bisogno G, Garaventa A, Cecchetto G, Ferrari A, Sotti G, Donfrancesco A, Madon E, Casula L, Carli M. Outcomes and prognostic factors after recurrence in children and adolescents with nonmetastatic rhabdomyosarcoma. *Cancer* 2005; 104 (1): 183-90.

Mc Mulkin HM, Yanchar NL, Fernández CV *et al*. Sentinel lymph node mapping and biopsy: a potential valuable tool in the management of childhood extremity rhabdomyosarcoma. *Pediatr Surg Int* 2003; 19: 453-6.

VII. Bibliografía

McDermott U, Ames RY, Iafrate AJ, Maheswaran S, Stubbs H, Greninger P, McCutcheon K, Milano R, Tam A, Lee DY, Lucien L, Brannigan BW, Ulkus LE, Ma XJ, Erlander MG, Haber DA, Sharma SV, Settleman J. Ligand-dependent platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha activation sensitizes rare lung cancer and sarcoma cells to PDGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* 2009; 69(9): 3937-46.

McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child* 2003; 88: 354-7.

McDowell HP, Foot AB, Ellershaw C, Machin D, Giraud C, Bergeron C. Outcomes in paediatric metastatic rhabdomyosarcoma: results of The International Society of Paediatric Oncology (SIOP) study MMT-98. *Eur J Cancer* 2010; 46 (9): 1588-95.

McKinnon H, Gherardi E, Reidy M, Bowyer D. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and MET Are Involved in Arterial Repair and Atherogenesis. *Am J Pathol* 2006; 168(1): 340-8.

McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 (Suppl 1): 3-10.

Meazza C, Casanova M, Zaffignani E, *et al.*: Efficacy of topotecan plus vincristine and doxorubicin in children with recurrent/refractory rhabdomyosarcoma. *Med Oncol* 2009; 26 (1): 67-72.

Meddeb M, Valent A, Danglot G, Nguyen VC, Duverger A, Fouquet F, Terrier-Lacombe MJ, Oberlin O, Bernheim A. MDM2 amplification in a primary alveolar rhabdomyosarcoma displaying a t(2;13)(q35;q14). *Cytogenet Cell Genet* 1996; 73(4): 325-30.

Mei SC, Wu RT. The G-rich promoter and G-rich coding sequence of basic fibroblast growth factor are the targets of thalidomide in glioma. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(8): 2405-14.

Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene* 1999; 18(38): 5340-8.

Meyer WH, Spunt SL. Soft tissue sarcomas of childhood. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 269-80.

Meyerhardt JA, Stuart K, Fuchs CS, Zhu AX, Earle CC, Bhargava P, Blaszkowsky L, Enzinger P, Mayer RJ, Battu S, Lawrence C, Ryan DP. Phase II study of FOLFOX, bevacizumab and erlotinib as first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2007; 18(7): 1185-59.

Meza-Junco J, Sawyer MB. Metastatic gastric cancer - focus on targeted therapies. *Biologics* 2012; 6: 137-46.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276(5309): 60-6.

Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggests Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 26: 72(6): 835-46.

Miller RW, Young JL Jr, Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer* 1995 (1 Suppl); 75: 395-405.

Minniti CP, Tsokos M, Newton WA Jr, Helman LJ. Specific expression of insulin-like growth factor-II in rhabdomyosarcoma tumor cells. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(2): 198-203.

VII. Bibliografía

Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, delle Fave G, Pederzoli P, Croce CM, Scarpa A. Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J Clin Oncol* 2010; 28(2): 245-55.

Missiaglia E, Selfe J, Hamdi M, Williamson D, Schaaf G, Fang C, Koster J, Summersgill B, Messahel B, Versteeg R, Pritchard-Jones K, Kool M, Shipley J. Genomic imbalances in rhabdomyosarcoma Cell lines affect expression of genes frequently altered in primary tumors: an approach to identify candidate genes involved in tumor development. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48(6): 455-67.

Mocellin S, Rossi CR, Brandes A, Nitti D. Adult soft tissue sarcomas: conventional therapies and molecularly targeted approaches. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 9-27.

Montaseri A, Busch F, Mobasher A, Buhrmann C, Aldinger C, Rad JS, Shakibaei M. IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1 β -induced cartilage degradation through down-regulation of NF- κ B signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *PLoS One* 2011; 6(12): e28663.

Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 2006; 11(7): 753-64.

Moretti A, Borriello A, Monno F, Criscuolo M, Rosolen A, Esposito G, Dello Iacovo R, Della Ragione F, Iolascon A. Cell division cycle control in embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas. *Eur J Cancer* 2002; 38(17): 2290-9.

Morotti A, Mila S, Accornero P, Tagliabue E, Ponzetto C. K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 2002; 21: 4885-93.

Motzer RJ, Michaelson MD, Rosenberg J, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Wilding G. Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 2007; 178(5): 1883-7.

Moumen A, Ieraci A, Patané S, Solé C, Comella JX, Dono R, Maina F. Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology* 2007; 45(5): 1210-7.

Moumen A, Patané S, Porras A, Dono R, Maina F. Met acts on Mdm2 via mTOR to signal Cell survival during development. *Development* 2007; 134(7): 1443-51.

Mucida D, Park Y, Cheroutre H. From the diet to the nucleus: vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Semin Immunol* 2009; 21(1): 14-21.

Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, Nowak E, Benson MJ, Kronenberg M, Noelle RJ, Cheroutre H. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity* 2009; 30(4): 471-3.

Mulligan LM, Matlashewski GJ, Scrable HJ, Cavenee WK. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(15): 5863-7.

N

Nahum A, Zeller L, Danilenko M, Prall OW, Watts CK, Sutherland RL, Levy J, Sharoni Y. Lycopene inhibition of IGF-1-induced cancer cell growth depends on the level of cyclin D1. *Eur J Nutr* 2006; 45(5): 275-82.

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1450-9.

VII. Bibliografía

Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; 342: 440-3.

Nakamura T. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* 1991; 3: 67-85.

Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80(3 Pt 2): S52-62.

Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* 1996; 10(9): 993-1001.

National Cancer Institute. Childhood Rhabdomyosarcoma Treatment. *J Clin Oncol* 2008; 26 (3): 406-13.

Naughton M, Picus J, Zhu X, Catalona WJ, Vollmer RT, Humphrey PA. Scatter factor-hepatocyte growth factor elevation in the serum of patients with prostate cancer. *J Urol* 2001; 165(4): 1325-8.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13(1): 9-22.

Neville HL, Andrassy RJ, Lobe TE *et al.* Preoperative staging, prognostic factors and outcome for extremity rhabdomyosarcoma: a preliminary report from the intergroup rhabdomyosarcoma study IV (1991-1997). *J Pediatr Surg* 2000; 35: 317-21.

Newton WA, Gehan EA, Webber BL, *et al.* Classification of rhabdomyosarcomas and relates sarcomas. Pathological aspects ad proposal for a

new clasiffication. An intergroup rhabdomyosarcoma study. *Cancer* 1995; 76: 1073-85.

Njar VC, Gediya L, Purushottamachar P, Chopra P, Belosay A, Patel JB. Retinoids in clinical use. *Med Chem* 2006; 2(4): 431-8.

Njar VC, Gediya L, Purushottamachar P, Chopra P, Vasaitis TS, Khandelwal A, Mehta J, Huynh C, Belosay A, Patel J. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg Med Chem* 2006; 14(13): 4323-40.

O

Obana K, Yang HW, Piao HY, Taki T, Hashizume K, Hanada R, Yamamoto K, Tanaka Y, Toyoda Y, Takita J, Tsuchida Y, Hayashi Y. Aberrations of p16INK4A, p14ARF and p15INK4B genes in pediatric solid tumors. *Int J Oncol* 2003; 23(4): 1151-7.

Oberlin O, Rey A, Sanchez de Toledo J, Martelli H, Jenney ME, Scopinaro M, Bergeron C, Merks JH, Bouvet N, Ellershaw C, Kelsey A, Spooner D, Stevens MC. Randomized comparison of intensified six-drug versus standard three-drug chemotherapy for high-risk nonmetastatic rhabdomyosarcoma and other chemotherapy-sensitive childhood soft tissue sarcomas: long-term results from the International Society of Pediatric Oncology MMT95 study. *J Clin Oncol*. 2012; 30(20): 2457-65.

Okcu MF, Pappo AS, Hicks J. The nonrhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins, 2011; 954-86.

Ohi S. Characterization, anticancer drug susceptibility and ATRA-induced growth inhibition of a novel Cell line (HUMEMS) established from pleural effusion of alveolar rhabdomyosarcoma of breast tissue. *Hum Cell* 2007; 20(2): 39-51.

VII. Bibliografía

Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20): 11709-14.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(5): 359-71.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001; 2(3): REVIEWS3005.1-12.

Ornitz DM. In: Skeletal Growth Factors. Canalis E, editor. Philadelphia: Lippincott; 2000. pp. 197-209.

O'Sullivan B, Shah J. New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Seminars in Surgical Oncology* 2003; 21(1): 30-42.

Ouchi KF, Yanagisawa M, Sekiguchi F, Tanaka Y. Antitumor activity of erlotinib in combination with capecitabine in human tumor xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57(5): 693-702.

P

Palmberg E, Johnsen JI, Paulsson J, Gleissman H, Wickström M, Edgren M, Ostman A, Kogner P, Lindskog M. Metronomic scheduling of imatinib abrogates clonogenicity of neuroblastoma cells and enhances their susceptibility to selected chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2009; 124(5): 1227-34.

Palomares T, Bilbao P, Alonso Varona A, Barbera-Guillem E. The addition of interleukin-2 to cyclophosphamide therapy can facilitate tumor growth of B16 melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40(5): 292-8.

Palomares T, Bilbao P, Del Olmo M, Castro B, Calle Y, Alonso-Varona A. In vitro and in vivo comparison between treatment with Adenosine Triphosphate (ATP) versus buthionine sulfoximine (BSO) on chemosensitization and tumor growth of B16 melanoma. *Melanoma* 1999; 9: 233-42.

Palomares T, Castro B, Del Olmo M, García-Alonso I, Alonso-Varona A. All-trans Retinoic Acid (ATRA) inhibits the growth promoting effect of serum derived from hepatectomized rats. In vitro study with the rhabdomyosarcoma S4MH Cell line. 36th Congress of the European Society for Sugical Research (ESSR), Santiago (España) 2001.

Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39684-95.

Pappo AS, Anderson JR, Crist WM, *et al.*: Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 1999; 17(11): 3487-93.

Pappo AS, Lyden E, Breitfeld P, Donaldson SS, Wiener E, Parham D, Crews KR, Houghton P, Meyer WH; Children's Oncology Group. Two consecutive phase II window trials of irinotecan alone or in combination with vincristine for the treatment of metastatic rhabdomyosarcoma: the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2007; 25(4): 362-69.

Parham, DM, Ellison, DA. Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1454–65.

Parham DM, Qualman SJ, Teot L, Barr FG, Morotti R, Sorensen PH, Triche TJ, Meyer WH; Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group.

VII. Bibliografía

Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31 (6): 895-901.

Pasquali D, Rossi V, Prezioso D, Gentile V, Colantuoni V, Lotti T, Bellastella A, Sinisi AA. Changes in tissue transglutaminase activity and expression during retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in primary cultures of human epithelial prostate cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(4): 1463-9.

Pavelić J, Pavelić L, Karadza J, Krizanac S, Unesić J, Spaventi S, Pavelić K. Insulin-like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma. *Mol Med* 2002; 8(3): 149-57.

Pavelic K, Buković D, Pavelić J. The role of insulin-like growth factor 2 and its receptors in human tumors. *Mol Med* 2002; 8(12): 771-80.

Peinemann F, Kröger N, Bartel C, Grouven U, Pittler M, Erttmann R, Kulig M. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for metastatic rhabdomyosarcoma--a systematic review. *PLoS One*. 2011 23; 6 (2): e17127.

Peles E, Yarden Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* 1993; 15(12): 815-24.

Peris-Bonet R, Salmerón D, Martínez-Beneito MA, Galceran J, Marcos-Gragera R, Felipe S, González V, Sánchez de Toledo Codina J; Spanish Childhood Cancer Epidemiology Working Group. Childhood cancer incidence and survival in Spain. *Ann Oncol* 2010; 21 (3): 103-10.

Pharman MD. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol* 2001; 14(5): 506-14.

Pietras K, Ostman A, Sjöquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, Rubin K. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 2001; 61(7): 2929-34.

Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial Cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989; 8(12): 3801-6.

Podar K, Tai YT, Hideshima T, Vallet S, Richardson PG, Anderson KC. Emerging therapies for multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2009; 14(1): 99-127.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7(3): 165-97.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18: 747-83.

Puxbaum V, Nimmerfall E, Bäuerl C, Taub N, Blaas PM, Wieser J, Mikula M, Mikulits W, Ng KM, Yeoh GC, Mach L. M6P/IGF2R modulates the invasiveness of liver cells via its capacity to bind mannose 6-phosphate residues. *J Hepatol* 2012; 57(2): 337-43.

Q

Qu Z, Van Ginkel S, Roy AM, Westbrook L, Nasrin M, Maxuitenko Y, Frost AR, Carey D, Wang W, Li R, Grizzle WE, Thottassery JV, Kern FG. Vascular endothelial growth factor reduces tamoxifen efficacy and promotes metastatic colonization and desmoplasia in breast tumors. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6232-40.

VII. Bibliografía

Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J* 1999; 18(17): 4633-44.

R

Radaeva S, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Fan S, Cai H, Strom S, Liu Y, El-Assal O, Gao B. Interferon-alpha activates multiple STAT signals and downregulates c-Met in primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 2002; 122: 1020-34.

Ragazzini P, Gamberi G, Pazzaglia L, Serra M, Magagnoli G, Ponticelli F, Ferrari C, Ghinelli C, Alberghini M, Bertoni F, Picci P, Benassi MS. Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Histol Histopathol* 2004; 19(2): 401-11.

Raines EW, Ross R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 1982; 257(9): 5154-60.

Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, Leoni P, Muddle J, Ivarsson M, Gerdin B, Denton CP, Bou-Gharios G, Black CM, Abraham DJ. Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 2006; 169(6): 2254-65.

Raney RB, Anderson JR, Barr FG, Donaldson SS, Pappo AS, Qualman SJ, Wiener ES, Maurer HM, Crist WM. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23 (4): 215-20.

Raney RB, Walterhouse DO, Meza JL, Andrassy RJ, Breneman JC, Crist WM, Maurer HM, Meyer WH, Parham DM, Anderson JR. Results of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group D9602 protocol, using vincristine and

dactinomycin with or without cyclophosphamide and radiation therapy, for newly diagnosed patients with low-risk embryonal rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2011; 29 (10): 1312-8.

Raney B, Huh W, Hawkins D, Hayes-Jordan A, Million L, Rodeberg D, Teot L, Anderson J; for the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group, Arcadia, CA. Outcome of patients with localized orbital sarcoma who relapsed following treatment on Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG) Protocols-III and -IV, 1984-1997: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60 (3): 371-6.

Rapkin L, Qayed M, Brill P, Martin M, Clark D, George BA, Olson TA, Wasilewski-Masker K, Alazraki A, Katzenstein HM. Gemcitabine and docetaxel (GEMDOX) for the treatment of relapsed and refractory pediatric sarcomas. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59 (5): 854-8.

Ravdin PM, Chamness GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review. *Gene* 1995; 159(1): 19-27.

Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS J* 2005; 272(22): 5723-41.

Reik W, Davies K, Dean W, Kelsey G, Constancia M. Imprinted genes and the coordination of fetal and postnatal growth in mammals. *Novartis Found Symp* 2001; 237: 19-42.

Resnicoff M, Coppola D, Sell C, Rubin R, Ferrone S, Baserga R. Growth inhibition of human melanoma cells in nude mice by antisense strategies to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 1994; 54(18): 4848-50.

VII. Bibliografía

Resnicoff M, Sell C, Rubini M, Coppola D, Ambrose D, Baserga R, Rubin R. Rat glioblastoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor are nontumorigenic and induce regression of wild-type tumors. *Cancer Res* 1994; 54(8): 2218-22.

Ricaud S, Vernus B, Bonnieu A. Response of human rhabdomyosarcoma cell lines to retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid sensitivity. *Exp Cell Res* 2005; 311(2): 192-204.

Riedel RF. Systemic therapy for advanced soft tissue sarcomas: highlighting novel therapies and treatment approaches. *Cancer* 2012; 118(6): 1474-85.

Riese DJ 2nd, Komurasaki T, Plowman GD, Stern DF. Activation of ErbB4 by the bifunctional epidermal growth factor family hormone epiregulin is regulated by ErbB2. *J Biol Chem* 1998; 273(18): 11288-94.

Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; 20(1): 41-8.

Rikhof B, de Jong S, Suurmeijer AJ, Meijer C, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor system and sarcomas. *J Pathol* 2009; 217(4): 469-82.

Rininsland F, Johnson TR, Chernicky CL, Schulze E, Burfeind P, Ilan J. Suppression of insulin-like growth factor type I receptor by a triple-helix strategy inhibits IGF-1 transcription and tumorigenic potential of rat C6 glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(11): 5854-9.

Rodeberg D, Arndt C, Breneman J, Lyden E, Donaldson S, Paidas C, Andrassy R, Meyer W, Wiener E. Characteristics and outcomes of rhabdomyosarcoma patients with isolated lung metastases from IRS-IV. *J Pediatr Surg* 2005; 40 (1): 256-62.

Rodeberg DA, Anderson JR, Arndt CA, Ferrer FA, Raney RB, Jenney ME, Brecht IB, Koscielniak E, Carli M, Bisogno G, Oberlin O, Rey A, Ullrich F, Stevens MC. Comparison of outcomes based on treatment algorithms for rhabdomyosarcoma of the bladder/prostate: combined results from the Children's Oncology Group, German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study, Italian Cooperative Group, and International Society of Pediatric Oncology Malignant Mesenchymal Tumors Committee. *Int J Cancer*. 2011; 128 (5):1232-39.

Roeb W, Boyer A, Cavenee WK, Arden KC. PAX3-FOXO1 controls expression of the p57Kip2 cell-cycle regulator through degradation of EGR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(46): 18085-90.

Roskoski R Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375(3): 287-91.

Roskoski R Jr. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356(2): 323-8.

Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001, 34:1135-48.

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46(2): 155-69.

Ross R. Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1989; 1(8648): 1179-82.

Rother KI, Accili D. Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatr Nephrol* 2000; 14(7): 558-61.

S

Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimmer A, Ouelaa R, Bracke M, De Wever O, Gespach C. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat* 2008; 11(4-5): 123-51.

Sandler E, Lyden E, Ruymann F, Maurer H, Wharam M, Parham D, Link M, Crist W. Efficacy of ifosfamide and doxorubicin given as a phase II "window" in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37 (5): 442-8.

Sauer M.K., Donoghue D.J. Identification of nonessential disulfide bonds and altered conformations in the v-sis protein, a homolog of the B chain of platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol* 1988; 8(3):1011-8.

Savage CR Jr, Hash JH, Cohen S. Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. *J Biol Chem* 1973; 248(22): 7669-72.

Saylors RL 3rd, Stine KC, Sullivan J, Kepner JL, Wall DA, Bernstein ML, Harris MB, Hayashi R, Vietti TJ; Pediatric Oncology Group. Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Clin Oncol* 2001; 19 (15): 3463-9.

Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* 2000; 149(7): 1419-32.

Schäfer BW, Niggli F. Multidisciplinary management of childhood sarcoma: time to expand. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10(8): 1163-6.

Schairer C, McCarty CA, Isaacs C, Sue LY, Pollak MN, Berg CD, Ziegler RG. Circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein (IGFBP)-3 levels and postmenopausal breast cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial (PLCO) cohort. *Horm Cancer* 2010; 1(2): 100-11.

Schiavetti A, Ingrosso A, Antenucci A, Federici T, Megaro G, De Luca L, Conti L. Circulating vascular endothelial growth factor in childhood solid tumors: plasma and serum measurements. *AntiCancer Res* 2012; 32(8): 3565-9.

Schiavetti A, McDowell HP, Conti L, Altavista P, Antenucci A, Pizer B, Dominici C. Vascular endothelial growth factor serum levels in children with newly diagnosed rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59(4): 627-30.

Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110(6): 669-72.

Schmahl J, Raymond CS, Soriano P. PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat Genet* 2007; 39(1): 52-60.

Schmidt M, Lichtner RB. EGF receptor targeting in therapy-resistant human tumors. *Drug Resist Updat* 2002; 5(1): 11-8.

Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 2007; 129(4): 723-33.

Seki T, Hagiya M, Shimonishi M, Nakamura T, Shimizu S. Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene. *Gene* 1991; 102(2): 213-9.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983-5.

Sengupta S, Sellers LA, Li RC, Fan TP. Targeting of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3 kinase inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 2955-61.

Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16 (1): 15-31.

Sessler RJ, Noy N. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell* 2005; 18(3): 343-53.

Sethi G, Ahn KS, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor-kappaB through IkappaBalpha kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of IkappaBalpha. *Oncogene* 2007; 26(52): 7324-32.

Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, McConkey DJ, McMahon G, Ellis LM. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59(21): 5412-6.

Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, Nakagawa K, Yoshidome H, Katahoka M, Nakajima N. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial Cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001, 34: 683-9.

Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose

deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 2007; 147(1): 153-63.

Siegfried JM, Gubish CT, Rothstein ME, Queiroz de Oliveira PE, Stabile LP. Signaling pathways involved in cyclooxygenase-2 induction by hepatocyte growth factor in non small-Cell lung cancer. *Mol Pharmacol* 2007; 72(3): 769-79.

Simeone AM, Tari AM. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(12): 1475-84.

Singh AB, Sugimoto K, Dhawan P, Harris RC. Juxtacrine activation of EGFR regulates claudin expression and increases transepithelial resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(5): C1660-8.

Singh AB, Sugimoto K, Harris RC. Juxtacrine activation of epidermal growth factor (EGF) receptor by membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor protects epithelial cells from anoikis while maintaining an epithelial phenotype. *J Biol Chem* 2007; 282(45): 32890-901.

Sleijfer S, van der Graaf WT, Blay JY. Angiogenesis inhibition in non-GIST soft tissue sarcomas. *Oncologist* 2008; 13(11): 1193-200.

Slooter GD, Marqiet RL, Jeekel J, Ijzermans JNM. Tumor growth stimulation after partial hepatectomy can be reduced by treatment with tumor necrosis factor alfa. *Br J Surg* 1995; 82: 129-32.

Smolen GA, Sordella R, Muir, B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW, Sgroi DC, Christensen JG, Settleman J, Haber DA. Amplification of Met may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2316-21.

VII. Bibliografía

Sole LA, Bellmunt J. Historia natural y estadiaje de los sarcomas de partes blandas. *Rev Cancer* 1998; 12: 137-42.

Song L, Turkson J, Karras JG, Jove R, Haura EB. Activation of STAT3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small Cell carcinoma cells. *Oncogene* 2003; 16: 102-8.

Song S, Wientjes MG, Gan Y, Au JL. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(15): 8658-63.

Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 1993; 123(1): 223-35.

Sonnenberg E, Weidner KM, Birchmeier C. Expression of the met-receptor and its ligand, HGF-SF during mouse embryogenesis. *EXS* 1993; 65: 381-94.

Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 201-21.

Sorensen PHB, Lunch JC, Qualman SJ, *et al.* PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2672-9.

Spano JP, Chodkiewicz C, Maurel J, Wong R, Wasan H, Barone C, Létourneau R, Bajetta E, Pithavala Y, Bycott P, Trask P, Liao K, Ricart AD, Kim S, Rixe O. Efficacy of gemcitabine plus axitinib compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: an open-label randomised phase II study. *Lancet* 2008; 371(9630): 2101-8.

Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. The presence of VEGF receptors on the luminal surface of endothelial cells affects VEGF distribution and VEGF signaling. *PLoS Comput Bio* 2009; 5(12): e1000622.

Stevens MC, Rey A, Bouvet N, Ellershaw C, Flamant F, Habrand JL, Marsden HB, Martelli H, Sanchez de Toledo J, Spicer RD, Spooner D, Terrier-Lacombe MJ, van Unnik A, Oberlin O. Treatment of nonmetastatic rhabdomyosarcoma in childhood and adolescence: third study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOP Malignant Mesenchymal Tumor 89. *J Clin Oncol* 2005; 23 (12): 2618-28.

Stratton MR, Moss S, Warren W, Patterson H, Clark J, Fisher C, Fletcher CD, Ball A, Thomas M, Gusterson BA, et al. Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene*; 5(9): 1297-301.

Streb JW, Long X, Lee TH, Sun Q, Kitchen CM, Georger MA, Slivano OJ, Blaner WS, Carr DW, Gelman IH, Miano JM. Retinoid-induced expression and activity of an immediate early tumor suppressor gene in vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 2011; 6(4): e18538.

Sutton LM, Warmuth MA, Petros WP, Winer EP. Pharmacokinetics and clinical impact of all-trans retinoic acid in metastatic breast cancer: a phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40(4): 335-41.

Suzuki K, Tokue A, Kamiakito T, Kuriki K, Saito K, Tanaka A. Predominant expression of fibroblast growth factor (FGF) 8, FGF4, and FGF receptor 1 in nonseminomatous and highly proliferative components of testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 2001; 439(5): 616-21.

Sweeney FL, Pot-Deprun J, Poupon MF, Chouroulinkov I. Heterogeneity of the growth and metastatic behavior of cloned cell lines derived from a primary rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1982; 42(9): 3776-82.

Szallasi Z. Fatal attractors: theoretical approaches to tumor differentiation. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(12): 459-60.

T

Tabbarah HJ. Sarcomas. *Manual of Bedside Oncology* 1983; 21: 332.

Tabernero J, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, André T, Van Laethem JL, Soulié P, Casado E, Verslype C, Valera JS, Tortora G, Ciardiello F, Kisker O, de Gramont A. Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(33): 5225-32.

Tada H, Sasada R, Kawaguchi Y, Kojima I, Gullick WJ, Salomon DS, Igarashi K, Seno M, Yamada H. Processing and juxtacrine activity of membrane-anchored betacellulin. *J Cell Biochem* 1999; 72(3): 423-34.

Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(4): 205-13.

Taniguchi E, Nishijo K, McCleish AT, Michalek JE, Grayson MH, Infante AJ, Abboud HE, Legallo RD, Qualman SJ, Rubin BP, Keller C. PDGFR-A is a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2008; 27(51): 6550-60.

Tassi E, Al-Attar A, Aigner A, Swift MR, McDonnell K, Karavanov A, Wellstein A. Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein. *J Biol Chem* 2001; 276(43): 40247-53.

Taulli R, Scuoppo C, Bersani F, Accornero P, Forni PE, Miretti S, Grinza A, Allegra P, Schmitt-Ney M, Crepaldi T, Ponzetto C. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 2006; 66(9): 4742-9.

Taylor JG 6th, Cheuk AT, Tsang PS, Chung JY, Song YK, Desai K, Yu Y, Chen QR, Shah K, Youngblood V, Fang J, Kim SY, Yeung C, Helman LJ, Mendoza A, Ngo V, Staudt LM, Wei JS, Khanna C, Catchpoole D, Qualman SJ, Hewitt SM, Merlino G, Chanock SJ, Khan J. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest* 2009; 119(11): 3395-407.

Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S. Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J Biol Chem* 1972; 247(18): 5928-34.

Thatcher JE, Isoherranen N. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(8): 875-86.

Thimmaiah KN, Easton JB, Houghton PJ. Protection from rapamycin-induced apoptosis by insulin-like growth factor-I is partially dependent on protein kinase C signaling. *Cancer Res* 2010; 70(5): 2000-9.

Tighe AP, Talmage DA. Retinoids arrest breast cancer Cell proliferation: retinoic acid selectively reduces the duration of receptor tyrosine kinase signalling. *J Cell Biochem Exp Cell Res* 2004; 301: 147-57.

Tomizawa M, Saisho H. Insulin-like growth factor (IGF)-II regulates CCAAT/enhancer binding protein alpha expression via phosphatidyl-inositol 3 kinase in human hepatoblastoma Cell lines. *J Cell Biochem* 2007; 102(1): 161-70.

VII. Bibliografía

Tortora G, Bianco R, Daniele G, Ciardiello F, McCubrey JA, Ricciardi MR, Ciuffreda L, Cognetti F, Tafuri A, Milella M. Overcoming resistance to molecularly targeted anticancer therapies: Rational drug combinations based on EGFR and MAPK inhibition for solid tumours and haematologic malignancies. *Drug Resist Updat* 2007; 10(3): 81-100.

Tortora G, Bianco R, Daniele G. Strategies for multiple signalling inhibition. *J Chemother* 2004; 16 (4):41-3.

Tortora G, Caputo R, Damiano V, Caputo R, Troiani T, Veneziani BM, De Placido S, Bianco AR, Zangemeister-Wittke U, Ciardiello F. Combined targeted inhibition of bcl-2, bcl-XL, epidermal growth factor receptor, and protein kinase A type I causes potent antitumor, apoptotic, and antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2): 866-71.

Tortora G, Caputo R, Damiano V, Melisi D, Bianco R, Fontanini G, Veneziani BM, De Placido S, Bianco AR, Ciardiello F. Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase A antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clin Cancer Res* 2003; 9(4): 1566-72.

Tortora G, Ciardiello F, Gasparini G. Combined targeting of EGFR-dependent and VEGF-dependent pathways: rationale, preclinical studies and clinical applications. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5(9): 521-30.

Tortora G, Gelardi T, Ciardiello F, Bianco R. The rationale for the combination of selective EGFR inhibitors with cytotoxic drugs and radiotherapy. *Int J Biol Markers* 2007; 22(1 Suppl 4): S47-52.

Toschi L, Jänne PA. Single-agent and combination therapeutic strategies to inhibit hepatocyte growth factor/Met signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19): 5941-6.

Tulasne D, Paumelle R, Weidner KM, Vandebunder B, Fafeur V. The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and Cell scattering. *Mol Biol Cell* 1999; 10(3): 551-65.

Tzimas G, Nau H. The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis. *Curr Pharm Des* 2001; 7(9): 803-31.

Tzimas G, Nau H. Vitamin A teratogenicity and risk assessment in the macaque retinoid model. *Reprod Toxicol* 2001; 15(4): 445-7.

V

Van Winkle P, Angiolillo A, Krailo M, Cheung YK, Anderson B, Davenport V, Reaman G, Cairo MS. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide (ICE) reinduction chemotherapy in a large cohort of children and adolescents with recurrent/refractory sarcoma: the Children's Cancer Group (CCG) experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2005; 44 (4): 338-47.

Vidal-Vanaclocha F, Alonso-Varona A, Ayala R, Boyano MD, Barberá-Guillem E. Coincident implantation growth and interaction sites within the liver of cancer and reactive hepatopoietic cells. *Int J Cancer* 1990; 46: 267-71.

Vassal G, Couanet D, Stockdale E, Geoffray A, Geoerger B, Orbach D, Pichon F, Gentet JC, Picton S, Bergeron C, Cisar L, Assadourian S, Morland B; French Society of Pediatric Oncology; United Kingdom Children's Cancer Study Group. Phase II trial of irinotecan in children with relapsed or refractory rhabdomyosarcoma: a joint study of the French Society of Pediatric Oncology and the United Kingdom Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2007; 25 (4): 356-61.

VII. Bibliografía

Venepalli NK, Goff L. Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol* 2013; 341636.

Vigneron A, Gamelin E, Coqueret O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res* 2008; 68(3): 815-25.

Villaflor VM, Salgia R. Targeted agents in non-small cell lung cancer therapy: What is there on the horizon? *J Carcinog* 2013; 12: 7.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 15: 93(8): 1493-5.

Völker T, Denecke T, Steffen I, *et al.*: Positron emission tomography for staging of pediatric sarcoma patients: results of a prospective multicenter trial. *J Clin Oncol* 2007; 25(34): 5435-41.

W

Wagner-Bohn A, Henze G, von Stackelberg A, Boos J. Phase II study of gemcitabine in children with relapsed leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46(2): 262.

Wagner-Bohn A, Paulussen M, Vieira Pinheiro JP, Gerss J, Stoffregen C, Boos J. Phase II study of gemcitabine in children with solid tumors of mesenchymal and embryonic origin. *Anticancer Drugs* 2006; 17(7): 859-64.

Walther MM, Figg WD, Linehan WM. Intravesical suramin: a novel agent for the treatment of superficial transitional-cell carcinoma of the bladder. *World J Urol* 1996; 14 Suppl 1: S8-11.

Walterhouse DO, Lyden ER, Breitfeld PP, Qualman SJ, Wharam MD, Meyer WH. Efficacy of topotecan and cyclophosphamide given in a phase II window trial in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2004; 22 (8): 1398-403.

Wang C. Childhood rhabdomyosarcoma: recent advances and prospective views. *J Dent Res* 2012; 91(4): 341-50.

Wang Y, Adachi Y, Imsumran A, Yamamoto H, Piao W, Li H, Li M, Arimura Y, Park MY, Kim D, Lee CT, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. Targeting for insulin-like growth factor-I receptor with short hairpin RNA for human digestive/gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol* 2010; 45(2): 159-70.

Wang Y, Lipari P, Wang X, Hailey J, Liang L, Ramos R, Liu M, Pachter JA, Bishop WR, Wang Y. A fully human insulin-like growth factor-I receptor antibody SCH 717454 (Robatumumab) has antitumor activity as a single agent and in combination with cytotoxics in pediatric tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(2): 410-8.

Wasylyk C, Zheng H, Castell C, Debussche L, Multon MC, Wasylyk B. Inhibition of the Ras-Net (Elk-3) pathway by a novel pyrazole that affects microtubules. *Cancer Res* 2008; 68(5): 1275-83.

Webb CP, Hose CD, Koocheckpour S, Jeffers M, Oskarsson M, Sausville E. The geldanamycins are potents inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network. *Cancer Res* 2000; 60: 342-9.

Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Curwen JO, Hennequin LF, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF. ZD4190: an orally active inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling with broad-spectrum antitumor efficacy. *Cancer Res* 2000; 60(4): 970-5.

VII. Bibliografía

Wedge SR, Ogilvie DJ. Inhibition of VEGF signal transduction. Identification of ZD4190. *Adv Exp Med Biol* 2000; 476: 307-10.

Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 7001-5.

Weidner KM, Hartmann G, Naldini L, Comoglio PM, Sachs M, Fonatsch C, Rieder H, Birchmeier W. Molecular characteristics of HGF-SF and its role in Cell motility and invasion. *EXS* 1993; 65:311-28.

Weigel BJ, Breitfeld PP, Hawkins D, et al.: Role of high-dose chemotherapy with hematopoietic stem Cell rescue in the treatment of metastatic or recurrent rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23 (5): 272-6.

Weihua X, Kolla V, Kalvakolanu V. Modulation of interferon action by retinoids. *J Biol Chem* 1997; 15: 9742-8.

Wellbrock J, Fiedler W. Clinical experience with antiangiogenic therapy in leukemia. *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11(9): 1053-68.

Wen J, Matsumoto K, Taniura N, Tomioka D, Nakamura T. Inhibition of colon cancer growth and metastasis by NK4 gene repetitive delivery in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358(1): 117-23.

Wen W.Ma, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 111-37.

Wen-Kyoo Y, McDonald D. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB reports* 2008; 41(12): 833-9.

Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 2011; 437(2): 199-213.

Whipple CA, Young AL, Korc M. A KrasG12D-driven genetic mouse model of pancreatic cancer requires glypican-1 for efficient proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 2012; 31(20): 2535-44.

Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(10): 1566-84.

Wilmes LJ, Pallavicini MG, Fleming LM, Gibbs J, Wang D, Li KL, Partridge SC, Henry RG, Shalinsky DR, Hu-Lowe D, Park JW, McShane TM, Lu Y, Brasch RC, Hylton NM. AG-013736, a novel inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinases, inhibits breast cancer growth and decreases vascular permeability as detected by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 2007; 25(3): 319-27.

Winette TA van der Graaf, Hans Gelderblom. New Systemic Therapy Options for Advanced Sarcomas. *Curr Treat Options Oncol* 2012; 13(3): 306–17.

Wolden SL, Anderson JR, Crist WM, *et al.* Indications for radiotherapy and chemotherapy after complete resection in rhabdomyosarcoma: a report from the intergroup rhabdomyosarcoma studies I to III. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3468-75.

Womer RB, Pressey JG. Rhabdomyosarcoma and soft tissue sarcoma in childhood. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 337-44.

Wong RW, Chan SY. Epidermal growth factor receptor: a transcription factor? *Trends Biochem Sci* 2001; 26(11): 645-6.

Wong RW, Chan SY. Semiquantitative immunoblots of membrane protein-epidermal growth factor. *Mol Biotechnol* 2000; 15(1): 65-7.

Wong RW, Kwan RW, Mak PH, Mak KK, Sham MH, Chan SY. Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2000; 275(24): 18297-301.

Wong RW. Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(1): 113-8.

Wong SF. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin Ther* 2005; 27(6): 684-94.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134(3): 489-92.

Wu HY, Snyder HM 3rd, Womer RB. Genitourinary rhabdomyosarcoma: which treatment, how much, and when. *J Pediatr Urol*. 2009; 5(6): 501-6.

Wysoczynski M, Liu R, Kucia M, Drukala J, Ratajczak MZ. Thrombin regulates the metastatic potential of human rhabdomyosarcoma cells: distinct role of PAR1 and PAR3 signaling. *Mol Cancer Res* 2010; 8(5): 677-90.

Wysoczynski M, Shin DM, Kucia M, Ratajczak MZ. Selective upregulation of interleukin-8 by human rhabdomyosarcomas in response to hypoxia: therapeutic implications. *Int J Cancer* 2010; 126(2): 371-81.

X

Xia Shujuan J, Pressey Joseph G, Barr Frederick G. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biology and Therapy* 2002; 1(2): 97-104.

Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsunuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(1): 247-52.

Xu J, Timares L, Heilpern C, Weng Z, Li C, Xu H, Pressey JG, Elmets CA, Kopelovich L, Athar M. Targeting wild-type and mutant p53 with small molecule CP-31398 blocks the growth of rhabdomyosarcoma by inducing reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Cancer Res* 2010; 70(16): 6566-76.

Xu YY, Guan DY, Yang M, Wang H, Shen ZH. All-trans-retinoic acid intensifies endoplasmic reticulum stress in N-acetylglucosaminyltransferase V repressed human hepatocarcinoma cells by perturbing homocysteine metabolism. *J Cell Biochem* 2010; 109(3): 468-77.

Y

Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002; 110(6): 771-81.

Yakar S, Wu Y, Setser J, Rosen CJ. The role of circulating IGF-1: lessons from human and animal models. *Endocrine*. 2002; 19(3): 239-48.

Yamada M., Ikeuchi T., Hatanaka H. The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 1997; 51(1): 19-37.

VII. Bibliografía

Yamada M, Tatsumi R, Yamanouchi K, Hosoyama T, Shiratsuchi S, Sato A, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Furuse M, Allen RE. High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298(3): C465-76.

Yamane A, Amano O, Slavkin HC. Insulin like growth factors, hepatocyte growth factor and transforming growth factor- α in mouse tongue myogenesis. *Develop Growth Differ* 2003; 45: 1-6.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37 (Suppl 4): S3-8.

Yin D, Vreeland F, Schaaf LJ, Millham R, Duncan BA, Sharma A. Clinical pharmacodynamic effects of the growth hormone receptor antagonist pegvisomant: implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 1000-9.

Yoshida K, Matsuzaki K. Differential Regulation of TGF- β /Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. *Front Physiol* 2012; 3:53.

Yoshiji H, Kuriyama S, Hicklin DJ, Huber J, Yoshii J, Miyamoto Y, Kawata M, Ikenaka Y, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. KDR/Flk-1 is a major regulator of vascular endothelial growth factor-induced tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 1999; 30(5): 1179-86.

Yu J, Liu XW, Kim HR. Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor- α -activated c-Jun NH₂-terminal kinase-1 is critical for PDGF-induced p21WAF1/CIP1 promoter activity independent of p53. *J Biol Chem* 2003; 278(49): 49582-8.

Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36(1): 49-59.

Yu Y, Khan J, Khanna C, Helman L, Meltzer PS, Merlino G. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* 2004; 10: 175–81.

Z

Zachow R, Uzumcu M. The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 2007; 195: 359-71.

Zeng Q, Chen S, You Z, Yang F, Carey TE, Saims D, Wang CY. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous Cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NF kappa B. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25203-8.

Zeng Q, McCauley LK, Wang CY. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein 1-dependent cyclooxygenase-2. Implication in head and neck squamous cell carcinoma progression. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 50137-42.

Zhan S, Shapiro DN, Helman LJ. Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* 1994; 94(1): 445-8.

Zhang C, Lu L, Li Y, Wang X, Zhou J, Liu Y, Fu P, Gallicchio MA, Bach LA, Duan C. IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2012; 130(9): 2003-12.

Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PH, Triche TJ. Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*. 2004; 64(17): 6026-34.

Zhang L, Hannay JA, Liu J, Das P, Zhan M, Nguyen T, Hicklin DJ, Yu D, Pollock RE, Lev D. Vascular endothelial growth factor overexpression by soft tissue sarcoma cells: implications for tumor growth, metastasis, and chemoresistance. *Cancer Res* 2006; 66(17): 8770-8.

Zhang L, Kashanchi F, Zhan Q, Zhan S, Brady JN, Fornace AJ, Seth P, Helman LJ. Regulation of insulin-like growth factor II P3 promotor by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56(6): 1367-73.

Zhang L, Wang C. PAX3-FKHR transformation increases 26 S proteasome-dependent degradation of p27Kip1, a potential role for elevated Skp2 expression. *J Biol Chem* 2003; 278(1): 27-36.

Zhang L, Wang C. F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F. *Oncogene* 2006; 25(18): 2615-27.

Zhang L, Zhan Q, Zhan S, Kashanchi F, Fornace AJ Jr, Seth P, Helman LJ. p53 regulates human insulin-like growth factor II gene expression through active P4 promoter in rhabdomyosarcoma cells. *DNA Cell Biol* 1998; 17(2): 125-31.

Zhang D, Samani AA, Brodt P. The role of the IGF-1 receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. *Horm Metab Res* 2003; 35(11-12): 802-8.

Zhang YL, Keng YF, Zhao Y, Wu L, Zhang ZY. Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 1998; 273(20): 12281-7.

Zhao P, Hoffman EP. Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn* 2004; 229: 380–92.

Zhao P. FGFR4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-FGFR4 transcriptional pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 429–38.