

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**NUEVAS COMBINACIONES FARMACOLÓGICAS  
EN SARCOMAS DE PARTES BLANDAS**

**María López Álvarez  
Graduada en Bioquímica  
Tesis doctoral**

**Director: Javier Martín Broto  
Instituto de Biomedicina de Sevilla**

**2022**





CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Junta de Andalucía

Dr. Javier Martín Broto,

CERTIFICA:

Que el trabajo experimental presentado en esta memoria para optar al título de Doctor en Biología, Biomedicina e Investigación Clínica por la Universidad de Sevilla titulado **“NUEVAS COMBINACIONES FARMACOLÓGICAS EN SARCOMAS DE PARTES BLANDAS”** ha sido realizado por María López Álvarez en el grupo de Terapias Avanzadas y Biomarcadores en Sarcomas (TERABIS) del área de Oncohematología y Genética del Instituto de Biomedicina de Sevilla bajo la dirección del Dr. Javier Martín Broto y la tutela académica del Dr. José Antonio Pérez Simón.

Sevilla, 10 de Enero de 2022

La doctoranda,

El director,

María López Álvarez

Javier Martín Broto



*A mis principales apoyos en esta vida, gracias por todo y más.*



## Índice

Resumen .....	i
Índice de figuras .....	iii
Índice de tablas .....	v
Abreviaturas .....	vi
Introducción .....	1
1.    Cáncer .....	1
2.    Sarcomas .....	2
2.1.    L-sarcomas: leiomiomasarcoma y liposarcoma .....	3
3.    Tratamientos en sarcomas de partes blandas .....	5
3.1.    Enfermedad localizada o clínicamente resecable .....	5
3.2.    Enfermedad localmente avanzada o metastásica .....	6
4.    Multirresistencia a fármacos .....	9
4.1.    Transportadores ABC: estructura y transporte .....	10
4.2.    Transportadores ABC en sarcomas y otros tumores. ....	13
4.3.    Estrategias de inhibición de MRP-1 .....	14
4.4.    Inhibidores tirosina quinasa (TKIs) como inhibidores de MRP-1. ....	16
5.    Eribulina como nuevo tratamiento en sarcomas .....	18
5.1.    Eribulina y su papel como agente antimicrotúbulo .....	18
5.2.    Otros mecanismos de acción de eribulina en el microambiente tumoral .....	23
5.3.    Eribulina en el contexto clínico. ....	24
5.4.    El potencial de combinación de eribulina .....	25
Hipótesis y objetivos .....	27
Materiales y métodos .....	31
1.    Cultivos celulares .....	33
1.1.    Líneas celulares .....	33
1.2.    Cultivo y conservación de las líneas celulares .....	33
2.    Ensayos celulares .....	34
2.1.    Ensayos de viabilidad celular .....	34
2.2.    Ensayo clonogénico .....	36
3.    Silenciamiento transitorio con ARN de interferencia .....	36
4.    Ensayos con ARN .....	37
4.1.    Extracción y cuantificación de ARN .....	37
4.2.    Transcripción reversa a ADNc (RT-PCR) .....	37
4.3.    PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) .....	38
5.    Ensayos con proteínas .....	39
5.1.    Extracción de proteínas .....	39
5.2.    Cuantificación de proteínas .....	39
5.3.    Electroforesis y <i>Western-blot</i> .....	39
5.4.    Bloqueo, incubación con anticuerpos primarios y secundarios, y revelado .....	41

5.5.	Cuantificación de bandas de <i>Western-blot</i> .....	42
6.	Inmunofluorescencia .....	42
7.	Citometría de flujo .....	43
7.1.	Ensayo de actividad de MRP-1 con el sustrato fluorescente CDFA .....	43
7.2.	Ensayo de actividad de P-gp con el sustrato fluorescente Rodamina 123.....	43
7.3.	Ensayo de acumulación de doxorrubicina intracelular .....	44
7.4.	Ensayo Anexina V – Yoduro de propidio.....	45
7.5.	Estudio del ciclo celular por citometría de flujo .....	45
8.	Ensayos <i>in vivo</i> .....	46
8.1.	Generación de modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX).....	46
8.2.	Tratamientos de los modelos xenoinjertados.....	46
8.3.	Necropsias.....	47
9.	Técnicas inmunohistoquímicas sobre las muestras de PDX .....	47
10.	Datos demográficos e histopatológicos de los pacientes reclutados en el ensayo fase III ISG-ST5 1001. ....	48
11.	Construcción de los microarrays tisulares (TMA) e inmunohistoquímicas relacionadas. ....	49
12.	Análisis estadísticos basados en los resultados de los TMAs .....	50
13.	Estudio <i>in-silico</i> de <i>docking</i> molecular .....	50
13.1.	<i>Docking</i> molecular proteína-ligando.....	51
13.2.	Estimación de la afinidad de unión proteína-ligando .....	51
14.	Análisis estadístico .....	52
	Resultados.....	54
	Capítulo I: Estudio de la inhibición de MRP-1 en combinación con quimioterápicos como estrategia de para revertir la resistencia a fármacos en sarcomas de partes blandas.....	56
1.	Valor pronóstico/predictivo de MRP-1 en pacientes tratados con antraciclinas e ifosfamida .....	56
2.	Expresión de <i>ABCB1</i> , <i>ABCC1</i> y <i>ABCG2</i> en un panel de líneas de sarcomas de partes blandas. ....	64
3.	Estudio de la inhibición en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp por los fármacos seleccionados.....	64
4.	Estudio de la retención de doxorrubicina tras el tratamiento con los.....	70
	inhibidores seleccionados en SPB.....	70
5.	Estudio de la expresión de las bombas de eflujo tras el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa. ....	71
6.	Análisis <i>in silico</i> de los moduladores de MRP-1 .....	73
7.	Estudio de la sensibilidad a quimioterápicos de las líneas de SPB .....	75
8.	Estudio de viabilidad celular tras el tratamiento con la triple combinación de fármacos en SPB.....	76
9.	Estudio de la muerte celular tras la triple combinación de fármacos en líneas de SPB. 82	
10.	Inhibición de <i>ABCC1</i> con un ARN corto de interferencia.....	87



Capítulo II: Estudio de la combinación de eribulina y gemcitabina en L-sarcomas: abordaje <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	90
1.    Estudios <i>in vitro</i> .....	90
1.1.    Estudio del mejor esquema de combinación de eribulina y gemcitabina .....	90
1.2.    Estudio del ciclo celular y la apoptosis tras la combinación de eribulina y gemcitabina. ....	95
1.3.    Estudio del daño al ADN tras el tratamiento combinado de eribulina y gemcitabina. ....	97
2.    Estudios <i>in vivo</i> .....	101
2.1.    Caracterización de los modelos xenoinjertados derivados de pacientes de leiomiocarcinoma y liposarcoma .....	101
2.2.    Primera aproximación <i>in vivo</i> : prueba piloto en varios modelos de leiomiocarcinoma y liposarcoma. ....	102
2.3.    Segunda aproximación: estudio del crecimiento tumoral y la supervivencia tras la combinación de eribulina y gemcitabina en los PDX seleccionados. ....	105
2.4.    Estudio de la vasculatura tumoral en respuesta al tratamiento de eribulina y gemcitabina. ....	109
Discusión .....	112
Capítulo I: Estudio de la inhibición de MRP-1 en combinación con quimioterápicos como estrategia de para revertir la resistencia a fármacos en sarcomas de partes blandas.....	114
Capítulo II: Estudio de la combinación de eribulina y gemcitabina en L-sarcomas: abordaje <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	122
Conclusiones .....	130
Bibliografía.....	134
Anexos.....	151
ANEXO I: Datos suplementarios .....	153
ANEXO II: Contribuciones científicas durante la etapa de doctorado .....	156

## Resumen

Los sarcomas de partes blandas son un grupo muy heterogéneo de tumores sólidos que se caracterizan por tener un origen mesenquimal, de difícil diagnóstico y con una alta tasa de recidiva. Los sarcomas se componen de unas 80 entidades que representan un 1 por ciento de los casos de cáncer, siendo la incidencia estimada de 6 nuevos casos por 100 000 habitantes y año. Pese al esfuerzo de búsqueda de tratamientos alternativos para estos tumores en las últimas décadas, las antraciclinas en monoterapia o su combinación con ifosfamida siguen siendo los tratamientos estándares en primera línea para sarcomas localmente avanzados o metastásicos. Aunque dichos pacientes en un primer momento responden a estos tratamientos, en la mayoría de los casos acaban recidivando. Uno de los mecanismos que limita la eficacia de la quimioterapia está en relación con la multirresistencia a drogas (MDR), y dentro de los mecanismos relacionados con MDR, la resistencia a fármacos debida a la expresión de bombas de eflujo es una de las más relevantes. La sobreexpresión de transportadores ABC como MRP-1 o P-gp, o el aumento de su actividad puede favorecer la resistencia. Una de las estrategias de inhibición de estos transportadores es el uso de inhibidores tirosina quinasa, que ya han sido descritos como potenciales moduladores de estas bombas en diversos tumores.

En nuestro estudio, en primer lugar, hemos validado el papel predictivo de MRP-1 en el contexto clínico en pacientes tratados con epirrubicina e ifosfamida del ensayo ISG-ST5 1001. En concreto, tanto la alta expresión como la alta intensidad de MRP-1 por inmunohistoquímica correlacionan con una peor supervivencia libre de recidiva y supervivencia global en pacientes tratados con epirrubicina e ifosfamida. Con el objetivo de inhibir MRP-1, varios inhibidores quinasa y tirosina quinasa fueron testados como potenciales inhibidores de este transportador. Entre los varios inhibidores testados, nilotinib y avapritinib fueron los que presentaron una mayor actividad inhibitoria sobre MRP-1. El efecto inhibitorio se debe a una bajada de la actividad y no de la expresión de estos transportadores tras el tratamiento. Estudios *in silico* confirmaron que estos dos inhibidores se unen con alta afinidad al dominio transmembrana de estas bombas ABC, y en particular a MRP-1. La triple combinación de doxorubicina y palifosfamida con avapritinib o nilotinib 24 horas previa, disminuye la viabilidad celular en mayor medida que la doble combinación de quimioterapia, aumentando a su vez la apoptosis celular. Este efecto se debe a la inhibición de MRP-1 como se ha demostrado con el silenciamiento génico de MRP-1. En general, nilotinib y avapritinib sensibilizan las células de sarcomas al tratamiento con doxorubicina y palifosfamida a través de la

inhibición de la actividad de MRP-1 por su posible acoplamiento en el canal transmembrana de este.

Por otro lado, aunque la supervivencia global de los pacientes con sarcoma avanzado ha aumentado en los últimos años debido sobre todo a la inclusión de nuevos fármacos en segundas líneas, éstas logran una supervivencia libre de progresión (SLP) mediana de menos de 5 meses, haciendo por tanto que exista una necesidad no cubierta en segundas líneas de tratamiento. Eribulina es un agente antimicrotúbulo que ha sido aprobado para su uso en segundas líneas únicamente en liposarcoma. Provoca una parada irreversible del ciclo celular en G2-M, además de producir cambios en el microambiente tumoral como un aumento de los microvasos viables en el tumor, que provocan una mayor oxigenación y una mejor infusión de los tratamientos en el tumor. En líneas de leiomiomas y liposarcomas, la combinación de eribulina previa a gemcitabina ha demostrado ser sinérgica. Esta sinergia encontrada *in vitro* se explica en parte por la acumulación de eventos hipodiploides (aumento de la población subG1) y por la acumulación de daño en el ADN. Además, esta combinación fue testada *in vivo* en modelos de PDX de leiomiomas y liposarcoma, encontrando que eribulina en combinación con gemcitabina es un esquema viable, capaz de producir un retraso en el crecimiento tumoral tras un ciclo de tratamiento. Nuestros experimentos indican que la combinación es más efectiva en los modelos de leiomiomas, donde tanto eribulina como la combinación producen cambios en la densidad de microvasos.

Ambas aproximaciones terapéuticas, diseñadas y testadas en esta tesis doctoral, pueden contribuir a mejorar los resultados de fármacos ya aprobados y en uso, para primera y segundas líneas en sarcomas avanzados. Nuestros experimentos dan soporte racional para abrir opciones de nuevos ensayos clínicos en sarcomas de partes blandas para comprobar el potencial valor añadido que vemos en los estudios preclínicos. Esta tesis enfoca, por lo tanto, en una investigación traslacional que pueda aplicarse a corto plazo en los pacientes.

## Índice de figuras

Figura 1: Características y mecanismos del cáncer. ....	1
Figura 2: Apariencia histológica de los leiomiomas. ....	4
Figura 3: Apariencia histológica de los diferentes subtipos de liposarcomas.....	5
Figura 4: Esquema del manejo clínico de los sarcomas de partes blandas en diferentes estadios de la enfermedad. ....	9
Figura 5: Modelo de transporte de sustratos del transportador MRP-1.....	11
Figura 6: Estructura de los transportadores ABC en la membrana celular. ....	12
Figura 7: Mecanismo hipotético de los moduladores de transportadores ABC implicados en la MDR. ....	15
Figura 8: Proteínas implicadas en la reparación de roturas de doble cadena.....	21
Figura 9: Mecanismos de acción de eribulina. ....	23
Figura 10: Expresión proteínica de MRP-1 en las muestras tumorales de los pacientes. ....	56
Figura 11: Análisis de supervivencia en el brazo estándar de tratamiento. ....	59
Figura 12: Análisis de supervivencia en el brazo experimental de tratamiento. ....	60
Figura 13: Análisis de supervivencia en la cohorte de pacientes de registro. ....	61
Figura 14: Gráfico de árbol por subgrupos histológicos. ....	63
Figura 15: Expresión de las bombas de eflujo <i>ABCB1</i> , <i>ABCC1</i> y <i>ABCG2</i> en un panel de líneas de sarcomas de partes blandas. ....	64
Figura 16: Efecto inhibitorio de los fármacos seleccionados en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024. ....	66
Figura 17: Efecto inhibitorio de los fármacos seleccionados en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp en líneas celulares SW872, SW982 e ICP060. ....	69
Figura 18: Acumulación intracelular de doxorubicina tras el tratamiento con los fármacos seleccionados.....	71
Figura 19: Expresión génica relativa de los transportadores ABC tras el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa en la línea celular CP0024. ....	72
Figura 20: Expresión génica relativa de los transportadores ABC tras el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa en la línea celular SK-UT-1. ....	73
Figura 21: Acoplamiento de avapritinib y nilotinib a la proteína MRP-1. ....	74
Figura 23: Estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento con palifosfamida en un panel de líneas de sarcomas. ....	76
Figura 24: Viabilidad celular en SK-UT-1 tras el tratamiento con doxorubicina, palifosfamida y avapritinib. ....	78
Figura 25: Viabilidad celular en SK-UT-1 tras el tratamiento con doxorubicina, palifosfamida y nilotinib. ....	79
Figura 26: Ensayo clonogénico en la línea celular SK-UT-1 tras tratamiento con la triple combinación de fármacos con nilotinib. ....	79
Figura 27: Ensayo clonogénico en la línea celular SK-UT-1 tras tratamiento con la triple combinación de fármacos con avapritinib. ....	80
Figura 28: Viabilidad celular en CP0024 tras el tratamiento con doxorubicina, palifosfamida y avapritinib. ....	81
Figura 29: Viabilidad celular en CP0024 tras el tratamiento con doxorubicina, palifosfamida y nilotinib. ....	82

Figura 30: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con nilotinib, doxorubicina y palifosfamida en SK-UT-1. ....	83
Figura 31: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con avapritinib, doxorubicina y palifosfamida en SK-UT-1.....	84
Figura 32: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con nilotinib, doxorubicina y palifosfamida en CP0024. ....	85
Figura 33: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con avapritinib, doxorubicina y palifosfamida en CP0024.....	86
Figura 34: Efecto inhibitorio del siARN de <i>ABCC1</i> en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024. ....	87
Figura 35: Inducción de la muerte celular por la triple combinación de doxorubicina, palifosfamida y el siARN contra <i>ABCC1</i> en SK-UT-1 y CP0024. ....	88
Figura 36: Viabilidad celular tras el tratamiento con eribulina o gemcitabina en líneas celulares de L-sarcomas. ....	90
Figura 37: Viabilidad tras los diferentes esquemas de combinación de eribulina y gemcitabina en líneas de L-sarcomas. ....	92
Figura 38: Ensayo clonogénico tras la combinación con eribulina y gemcitabina en líneas de L-sarcomas. ....	94
Figura 39: Estudio de la alteración del ciclo celular tras el tratamiento con eribulina y gemcitabina. ....	96
Figura 40: Estudio de la apoptosis celular tras la combinación de eribulina y gemcitabina en líneas de L-sarcomas. ....	97
Figura 41: Estudio del daño al ADN tras la combinación de eribulina y gemcitabina en la línea celular 93T449.....	98
Figura 42: Estudio del daño al ADN tras la combinación de eribulina y gemcitabina en la línea celular SK-UT-1.....	99
Figura 43: Estudio del daño al ADN tras la combinación de eribulina y gemcitabina en la línea celular CP0024.....	100
Figura 44: Análisis por <i>Western-blot</i> de los niveles de las proteínas $\gamma$ -H2AX y p21 tras la combinación con eribulina y gemcitabina en las líneas 93T449, CP0024 y SK-UT-1.....	100
Figura 45: Esquema de los modelos xenoinjertados utilizados y el tratamiento correspondiente. ....	102
Figura 46: Aproximación <i>in vivo</i> de la combinación de eribulina y gemcitabina en los modelos LMS-IBiS-001, LMS-IBiS-002 y LMS-IBiS-009. ....	103
Figura 47: Aproximación <i>in vivo</i> de la combinación de eribulina y gemcitabina en los modelos LMS-IBiS-009, LMS-IBiS-010 y LPS-IBiS-015.....	104
Figura 48: Efecto de la combinación de eribulina y gemcitabina <i>in vivo</i> en el modelo de PDX LMS-IBiS-002. ....	106
Figura 49: Efecto de la combinación de eribulina y gemcitabina <i>in vivo</i> en el modelo de PDX LMS-IBiS-010. ....	107
Figura 50: Efecto de la combinación de eribulina y gemcitabina <i>in vivo</i> en el modelo de PDX LPS-IBiS-015. ....	108
Figura 51: Inmunohistoquímica de CD31 en las muestras tumorales de los xenoinjertos derivados de pacientes. ....	110

## Índice de tablas

Tabla 1: Líneas celulares utilizadas .....	33
Tabla 2: Fármacos utilizados .....	34
Tabla 3: Compuestos testados como inhibidores de MRP-1 y P-gp .....	34
Tabla 4: Sondas TaqMan™ utilizadas .....	38
Tabla 5: Receta de los geles running de electroforesis .....	40
Tabla 6: Receta de los geles stacking de electroforesis .....	40
Tabla 7: Anticuerpos utilizados .....	41
Tabla 8: Datos demográficos de los pacientes pertenecientes al ensayo ISG-STS 1001. ....	57
Tabla 9: Distribución de la expresión de MRP-1 por subtipo histológico.....	58
Tabla 10: Análisis multivariante de factores afectando a la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.....	63
Tabla 11: Efecto inhibitorio de los fármacos seleccionados en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp. ....	66
Tabla 12: Energía de afinidad media de los fármacos testados frente a los transportadores ABC. ....	74
Tabla 13: Predicción de la afinidad de unión de avapritinib y nilotinib con los transportadores ABC calculado con KDeep. ....	75
Tabla 14: Concentraciones utilizadas para el estudio de la viabilidad celular tras tratamiento con inhibidores tirosina quinasa y quimioterapéuticos.....	77
Tabla 15: IC <sub>50</sub> para eribulina y gemcitabina, expresado en nM, en líneas celulares de L-sarcomas. ....	90
Tabla 16: IC <sub>50</sub> , IC <sub>75</sub> y IC <sub>90</sub> en las líneas celulares CP0024, SK-UT-1, 94T778 y 93T449 tras las diferentes secuencias de tratamiento. ERI: eribulina; GEM: gemcitabina. ....	91
Tabla S1: Análisis univariante del ensayo ISG-STS 1001.....	153
Tabla S2: Energía de afinidad de avapritinib y nilotinib para las distintas estructuras de MRP-1. ....	154
Tabla S3: Índices de combinación para las diferentes combinaciones secuencias de eribulina y gemcitabina en las líneas celulares CP0024, SK-UT-1, 93T449 y 94T778.....	155

## Abreviaturas

ABC: Transportadores dependientes de ATP (del inglés, *ATP Binding Cassette*)

ABC1: *ATP Binding Cassette* Subfamilia B Miembro 1

ABCC1: *ATP Binding Cassette* Subfamilia C Miembro 1

ABCG2: *ATP Binding Cassette* Subfamilia G Miembro 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATM: Atasia telangiectasia mutada

ATP: Adenosín trifosfato

ATR: ATM y proteína relacionada con Rad-3

Bcl-2: Familia de proteínas *B-cell lymphoma 2*

BCRP: Proteína de resistencia al cáncer de mama (del inglés, *Breast Cancer Resistance Protein*)

CDK: Serina/treonina quinasa

CFDA: 5(6)-diacetato de carboxifluoresceína

Chk1/2: quinasa *checkpoint 1* ò 2

CI: Índice de combinación (del inglés, *combination index*)

DDR: Respuesta de daño al ADN (del inglés, *DNA damage response*)

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido (del inglés, *Dimethyl sulfoxide*)

DSB: Roturas de doble cadena (del inglés *Double-strand break*)

DXR: Doxorubicina

ERI: Eribulina

GCSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos (del inglés, *Granulocyte-colony stimulating factor*)

GEM: Gemcitabina

GIST: Tumor del estroma gastrointestinal (del inglés, *Gastrointestinal stromal tumor*)

GSH: Glutación reducido

GST- $\pi$ : Glutación S-transferasa pi

H&E: Hematoxilina y eosina

HR: Coeficiente de riesgo (del inglés, *Hazard ratio*) // Recombinación homóloga (del inglés, *Homologous recombination*)

IP: Yoduro de propidio

IQR: Rango intercuartílico (del inglés, *interquartile range*)

LMS: Leiomioma

LPS: Liposarcoma

MDR: Multirresistencia a fármacos (del inglés, *multidrug resistance*)

MEK: Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos (del inglés, *Mitogen-activated proteina kinase kinase*)

MFS: Mixofibrosarcoma

MPNST: Tumor de vaina nerviosa periférico (del inglés, *malignant peripheral nerve sheat tumor*)

MRP-1: Proteína de farmacoresistencia múltiple 1 (del inglés, *Multidrug resistance protein 1*)

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetooxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna

MVD: Densidad de microvasos (del inglés, *Microvessels density*)

NBD: Dominio de unión a nucleótidos (del inglés, *Nucleotide binding domain*)

ORR: Tasas de respuestas totales (del inglés, *overall response rate*)

PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate buffered saline*)

PDX: Xenoinjerto derivado de paciente (del inglés *Patient-derived xenograft*)

P-gp: Glicoproteína p (del inglés, *P-glycoprotein*)

q-PCR: Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa.

RECIST: Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (del inglés, *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*)

Rho-123: Rodamina 123 (del inglés, *Rhodamine 123*)

RMS: Rabdomiosarcoma

RT: Radioterapia

SG: Supervivencia global

siARN: ARN de interferencia pequeño

SLP: Supervivencia libre de progresión

SPB: Sarcomas de partes blandas

SS: Sarcoma sinovial

TBS: Tris buffer salino

TFS: Tumor fibroso solitario

TK: tirosina quinasa (del inglés, *Tyrosin kinase*)

TKIs: Inhibidores de tirosina quinasa (del inglés, *tyrosin kinase inhibitors*)

TMA: Microarray tisular (del inglés, *Tissue microarray*)

UPS: Sarcoma pleomórfico indiferenciado (del inglés, *undifferentiated pleomorphic sarcoma*)

uLMS: Leiomiomasarcoma uterino

γH2AX: Miembro de la familia de histonas H2AX fosforilada



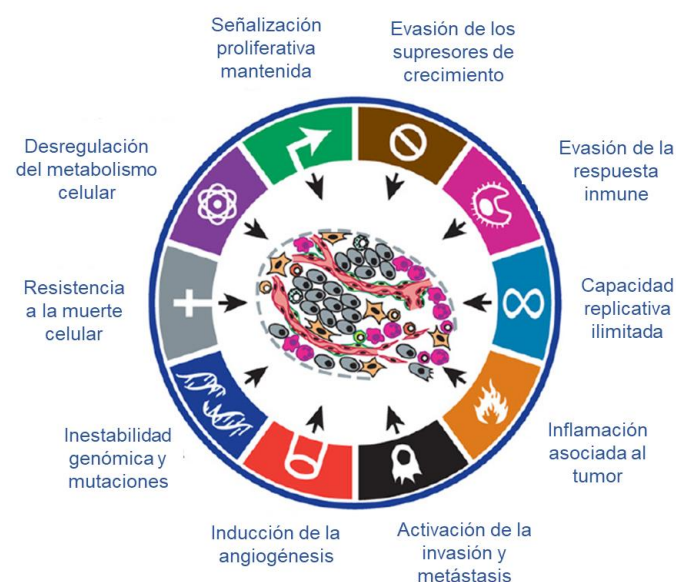


# Introducción



## 1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial y cuyas principales características son el crecimiento descontrolado de las células y la invasión de tejidos cercanos. Algo tan complejo como las neoplasias, se puede organizar en función de seis principios que promueven dichas características: una señalización proliferativa mantenida en el tiempo, la capacidad de evadir a los supresores de crecimiento, la adquisición de resistencia a la muerte celular, una capacidad replicativa ilimitada, la inducción de angiogénesis y la activación de la invasión y, por tanto, de la capacidad de metastatizar (1). Sin embargo, en los últimos años otros mecanismos han tomado el protagonismo como procesos habilitantes para el desarrollo y mantenimiento del cáncer: la inestabilidad genómica y acúmulo de mutaciones, la desregulación del metabolismo celular, la evasión de la respuesta inmune y la inflamación asociada al tumor (Figura 1) (2). Por tanto, el cáncer no se trata de un proceso aislado, sino que es un proceso que implica diferentes mecanismos celulares en el que tiene una gran importancia el microambiente del tumor y las distintas células que lo componen: células madre del cáncer pluripotenciales, células endoteliales, pericitos, células inflamatorias del sistema inmune, células cancerígenas, los fibroblastos asociados y el estroma que rodea al tumor, entre otras (2).



**Figura 1: Características y mecanismos del cáncer.** Adaptada de D. Hanahan y R.A. Weinberg (2011)

En cuanto a la incidencia del cáncer, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha estimado que en 2020 se diagnosticaron 19,3 millones de casos nuevos

en el mundo y que esta incidencia seguirá aumentando hasta los 30,2 millones de casos nuevos al año en 2040 (3). En España en 2021, según REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer), se alcanzarán los 276 239 casos. Los más frecuentemente diagnosticados son de colon y recto, próstata, mama, pulmón y vejiga urinaria. El cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en el mundo, alcanzando los 9,9 millones de muertes en 2020, y unos 113 054 casos en España (3). Con una incidencia mucho más baja se encuentra un conjunto de tumores considerados raros, dentro de los cuales se encuentran los denominados sarcomas, con una gran mortalidad asociada.

## **2. Sarcomas**

Los sarcomas son un grupo heterogéneo de neoplasias con un origen mesenquimal que afecta a niños, adolescentes y adultos. Representan el 1% de todos los casos de cáncer en adultos con una tasa de incidencia de 5,6 casos por cada 100 000 habitantes por año y se diagnostican unos 27 908 nuevos casos por año en Europa (4). La media de edad de los pacientes al diagnóstico es de 60 años. Son uno de los tumores más difíciles de diagnosticar debido a varios factores entre los que destaca su clasificación en más de 100 tipos diferentes (teniendo en cuenta subtipos de agresividad intermedia) que, unido a su baja incidencia, hace que se requieran patólogos expertos para un correcto diagnóstico. Además, los criterios típicos de malignidad de un cáncer epitelial no son aplicables a los tumores mesenquimales, teniendo que combinar diferentes aspectos como la morfología, técnicas inmunohistoquímicas y técnicas de genética molecular (4-6). Para un manejo adecuado, un paciente con sarcoma debe ser discutido por equipos expertos multidisciplinares, compuestos por oncólogos clínicos, radioterápicos, patólogos, radiólogos, cirujanos y biólogos moleculares, entre otros. De hecho, se ha demostrado que la supervivencia libre de recidiva de estos pacientes aumenta cuando cuentan con un abordaje multidisciplinar desde el inicio de la enfermedad y son tratados en centros de referencia (7).

La etiología de estos tumores es desconocida, aunque hay ciertos factores que se han asociado a ellos como: a) radiación ionizante; b) exposición a varios agentes químicos como benzofenonas; c) síndromes genéticos hereditarios como Li Fraumeni, neurofibromatosis (NF1), síndrome de Gardner o de Werner y d) traumatismos previos en la zona de aparición del sarcoma (8).

Los sarcomas pueden tener su origen en el tejido óseo o en los tejidos blandos como el músculo, clasificándose así en sarcomas óseos o de partes blandas (SPB). Según la 5ª edición de la clasificación de la organización mundial de la salud, se organizan en 12 grandes subtipos de tumores en función de su diferenciación: adipocíticos,

fibroblásticos/miofibroblásticos, fibrohistocíticos, vasculares, pericíticos (perivasculares), del músculo liso, del músculo esquelético, del estroma gastrointestinal, condro-óseos, de la vaina del nervio periférico, de diferenciación incierta y sarcomas desdiferenciados de célula redonda de hueso y tejidos blandos (4, 6, 9). Centrándonos en los SPB, su localización más común es en las extremidades (supone al menos 60% de los SPB), siendo los liposarcomas el tipo más frecuente. En cuanto a los sarcomas viscerales, son un 22% de todos los SPB y los más frecuentes son los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y los leiomiomas uterinos (uLMS) (10).

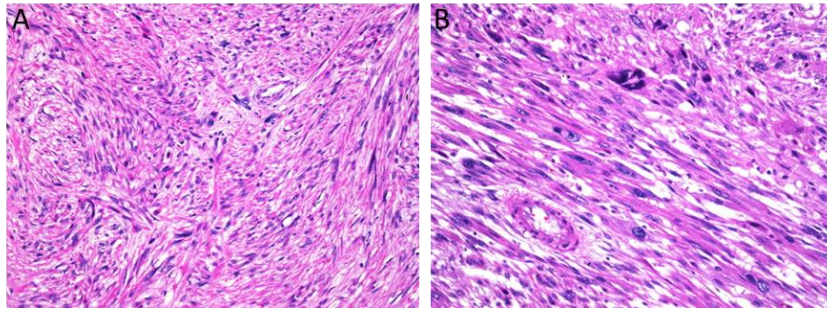
## **2.1. L-sarcomas: leiomioma y liposarcoma**

Dos de los tipos más frecuentes de sarcomas son los denominados L-sarcomas: liposarcomas (LPSs) y leiomiomas (LMSs). Su incidencia es de cerca de 1/100 000 al año mientras que en los otros sarcomas es de 2/1 000 000 por año (11).

### **2.1.1. Leiomioma**

El LMS es una neoplasia mesenquimal maligna compuesta por células con características de linaje de músculo liso, con anomalías genéticas complejas y representa el 24% de todos los sarcomas. Los LMS pueden surgir en cualquier parte del cuerpo siendo sus localizaciones más comunes extremidades, pared de tronco, retroperitoneo y vísceras. Dentro de estas últimas, el útero es el más frecuente asiento de LMS (12, 13).

Respecto a la histología, el LMS se compone de fascículos de células fusiformes con núcleos alargados e hiper cromáticos con abundante citoplasma eosinófilo. La mayoría de ellos son positivos para actina del músculo liso, desmina y H-caldesmon, aunque estos marcadores no son específicos de diferenciación a músculo liso (14). En comparación con otros tumores, la carga mutacional es baja en LMS, pero, aun así, se han asociado diversos cambios moleculares y citogenéticos complejos como mutaciones y deleciones en *RB1*, *TP53* y *PTEN*. Se han descrito tres subtipos moleculares de LMS en función de la expresión de diferentes genes; el primer subtipo expresa genes asociados a diferenciación a músculo liso siendo un subtipo convencional de LMS con un pronóstico mejor que el grupo II, que aúna formas desdiferenciadas de LMS. El tercer subtipo, en cambio, parece tener preferencia por una localización anatómica concreta, el útero, aunque hay uLMS distribuidos en todos los grupos (Figura 2) (15).



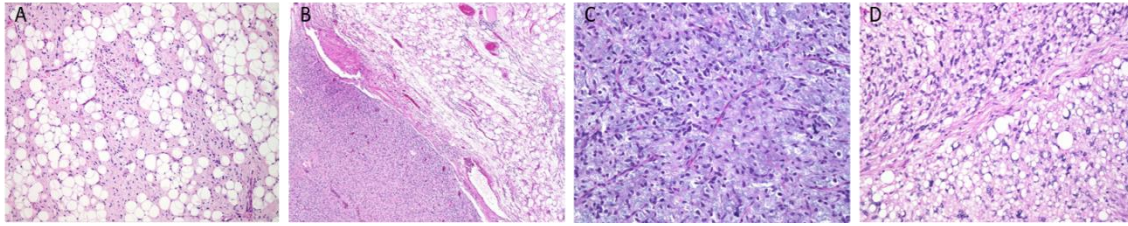
**Figura 2: Apariencia histológica de los leiomiosarcomas.** (A) Hematoxilina-eosina (H&E) de un leiomiosarcoma. (B) H&E de un leiomiosarcoma uterino (imagen adaptada de Web of Pathology).

### 2.1.2. Liposarcoma

Los LPS son tumores malignos de diferenciación adipocítica, siendo también de los tipos con una mayor incidencia dentro de los SPB (15-20%). Su localización es en un 24% de los casos en las extremidades y en un 45% en el retroperitoneo. Este tipo de sarcoma se divide en cuatro subtipos: bien diferenciado, desdiferenciado, mixoide y pleomórfico. Gracias a la comparación del comportamiento de estos subtipos y al estudio de la patología molecular subyacente, el manejo de estos tumores se ha adaptado a cada subtipo (16, 17).

El LPS bien diferenciado es uno de los subtipos más comunes, representando un 45% de todos los LPSs, con picos de incidencia en la sexta y séptima década de la vida. Suelen encontrarse en las extremidades en el 75% de los casos con una mortalidad asociada baja y los casos retroperitoneales tienen una capacidad de recidiva mayor y, por tanto, una mayor tasa de mortalidad (30-40%). Se caracterizan por ser grandes masas de densidad grasa bien delimitada, lobulada, con regiones de mayor densidad correspondiente a zonas fibrosas o escleróticas y los genes *MDM2* y *CDK4* suelen estar amplificados en estos tumores (16-19) (Figura 3A).

El LPS desdiferenciado (LPS DD) representa un 20% de todos los LPSs, con un pico de incidencia similar al LPS bien diferenciado. La localización principal de este tumor es el retroperitoneo seguido de las extremidades y, en muchas ocasiones, coexisten en el tumor un componente adipocíticos bien diferenciado, junto con un componente desdiferenciado. Este último representa otro tipo de sarcoma, usualmente de alto grado, aunque puede haber componentes desdiferenciados de bajo grado. El LPS DD tiene un peor pronóstico que los LPS bien diferenciados, especialmente en retroperitoneo (18-20) (Figura 3B). Molecularmente, la amplificación de *MDM2* es la firma molecular que ayuda a confirmar el diagnóstico de los LPS DD o bien diferenciados (18).



**Figura 3: Apariencia histológica de los diferentes subtipos de liposarcomas.** (A). Hematoxilina-eosina de un liposarcoma bien diferenciado. (B). H&E de un liposarcoma dediferenciado. (C). H&E de un liposarcoma mixoide. (D). H&E de liposarcoma pleomórfico. Adaptada de Web of Pathology.

El LPS mixoide representa un tercio de los casos dentro de los LPS y a diferencia de los dos anteriores, puede darse en grupos de edad más jóvenes, teniendo su pico de incidencia en la tercera-cuarta década de la vida. Su histología se caracteriza por un marcado estroma mixoide con una distribución vascular plexiforme. Se observan células de tipo lipoblasto en número variable, siendo generalmente poco frecuentes. En el caso de liposarcoma mixoide de bajo grado, las células predominantes son monomorfas, ovales o fusiformes, siendo el ambiente paucicelular. En una transformación a alto grado, se ven nidos de células redondas u ovales en porcentaje mayor del 5% (Figura 3C). Normalmente se localizan en extremidades (muslo) siendo masas heterogéneas multinodulares. Su agresividad y pronóstico viene dado por la celularidad (a mayor celularidad, mayor riesgo de metástasis), la presencia de necrosis, el tamaño tumoral y la sobreexpresión de p53. La tasa de recidiva local ronda el 15-30% mientras que la recidiva a distancia es algo mayor (20-40%) (20-23). Este subtipo de LPS tiene una traslocación recurrente:  $[t(12;16)(q13;p11.2) FUS-DDIT3]$  (24, 25).

El LPS pleomórfico es un 5% de todos los LPS y se da en su mayoría en personas mayores de 50 años, siendo su localización más común las extremidades (60%) aunque también puede darse en otras localizaciones menos recurrentes como pared de tronco abdominal y torácico. Histológicamente, se caracteriza por grandes lipoblastos multivacuolados o por grandes células pleomórficas gigantes, ricas en lípidos y vacuolas. Debido a su baja incidencia, son más desconocidos a nivel molecular, pero son tumores de alto grado y con una elevada tasa tanto de recidivas locales como de metástasis a distancia (20, 26) (Figura 3D).

### 3. Tratamientos en sarcomas de partes blandas

El manejo de los SPBs en la clínica tiene su base en el estadio de la enfermedad: si es localizada y/o clínicamente resecable o bien si es localmente avanzada o metastásica.

#### 3.1. Enfermedad localizada o clínicamente resecable



Cuando al diagnóstico la enfermedad es localizada y cabe la posibilidad de reseccarla, la cirugía del tumor primario es el tratamiento estándar. Debe hacerse por un cirujano especializado en esta patología y los márgenes libres de tumor (R0) son pieza clave para un mejor pronóstico de la enfermedad (27). La radioterapia perioperatoria, preferentemente neoadyuvante, se recomienda en lesiones de alto grado (salvo algunas superficiales pequeñas) y en algunas de bajo grado (28). En ocasiones, si la resección tuvo márgenes positivos (R1 o R2), se puede volver a reoperar en un centro de referencia.

La cirugía puede ir acompañada en algunos casos de RT y QT complementarias, que pueden ser preoperatorias (tratamiento neoadyuvante) o postoperatorias (tratamiento adyuvante). La quimioterapia perioperatoria puede considerarse estándar en pacientes de alto riesgo de extremidades y pared de tronco, con histologías no quimiorresistentes. (29, 30). Referente a la neoadyuvancia, existen estudios que muestran un beneficio en SG y SLP con esquema de antraciclinas más ifosfamida en pacientes con sarcomas localizados grado 2/3 clínicamente resecables o localizados irresecables. Un ensayo clínico ha estudiado el beneficio de dar QT según la histología tumoral pero el tratamiento estándar con antraciclinas se ha mantenido como el régimen estándar en neoadyuvancia (31, 32). Con una mediana de seguimiento de 52 meses, la quimioterapia por histotipo no se asoció a una mejora en la SLP ni en la SG (33). Por tanto, la mayoría de los expertos coinciden en la importancia de la neoadyuvancia cuando son tumores resecables de grado 2/3 pero no se recomienda el uso de adyuvancia postoperatoria (34). Esta QT neoadyuvante también puede ir acompañada de RT, que tiene ciertas ventajas como menor complicaciones entorno a la cicatriz y desventajas como la necesidad de mayores volúmenes de radiación o posteriores complicaciones como fibrosis (35) (Figura 4).

### **3.2. Enfermedad localmente avanzada o metastásica**

Para pacientes en los que la cirugía no es posible y desde el diagnóstico la enfermedad está localmente avanzada o es metastásica, existen dos posibilidades: si tiene enfermedad pulmonar localizada resecable, se puede llevar a cabo la metastasectomía junto a QT pre o post operación y en caso de que no sean resecables o existan metástasis extrapulmonares se tratará al paciente con tratamiento sistémico (11).

El tratamiento sistémico estándar en primera línea para SPB se basa en antraciclinas, ya que ningún estudio de combinación de fármacos ha mostrado una SG superior que doxorubicina por si sola (36). En dichos estudios, no se ha demostrado un

beneficio significativo en supervivencia global, aunque sí que lo ha habido en supervivencia libre de progresión. En uno de los últimos estudios, no hubo diferencias significativas en SG entre doxorubicina por sí sola y el grupo de doxorubicina con ifosfamida (12,8 vs 14,3 meses; *hazard ratio* [HR] 0,83 [95,5% CI 0,67-1,03];  $p=0,076$ ). En cuanto a la SLP, fue mayor en el grupo de doxorubicina e ifosfamida de manera significativa (7,4 meses [95% CI 6,6-8,3] frente a 4,6 meses [95%CI 0,60-0,90];  $p=0,003$ ). En ciertos contextos (intento de alivio rápido de síntomas o intento de conversión de una lesión a operable) también se utiliza terapia combinada de antraciclinas con ifosfamida (o con dacarbazina en el caso de los LMS) con mejores resultados respecto a doxorubicina en monoterapia (36). Además, en los últimos años, la combinación de doxorubicina y olaratumab, un anticuerpo monoclonal frente a PDGFR $\alpha$  había mostrado muy buenos resultados en un ensayo clínico fase II en comparación con doxorubicina en monoterapia, aumentando 11,8 meses la SG de los pacientes con SPB y 2,5 meses la mediana de SLP. Sin embargo, este resultado no se ha mantenido en el ensayo clínico fase III entre ambos grupos de tratamiento, retirándose la aprobación de dicha combinación en estos pacientes (37, 38).

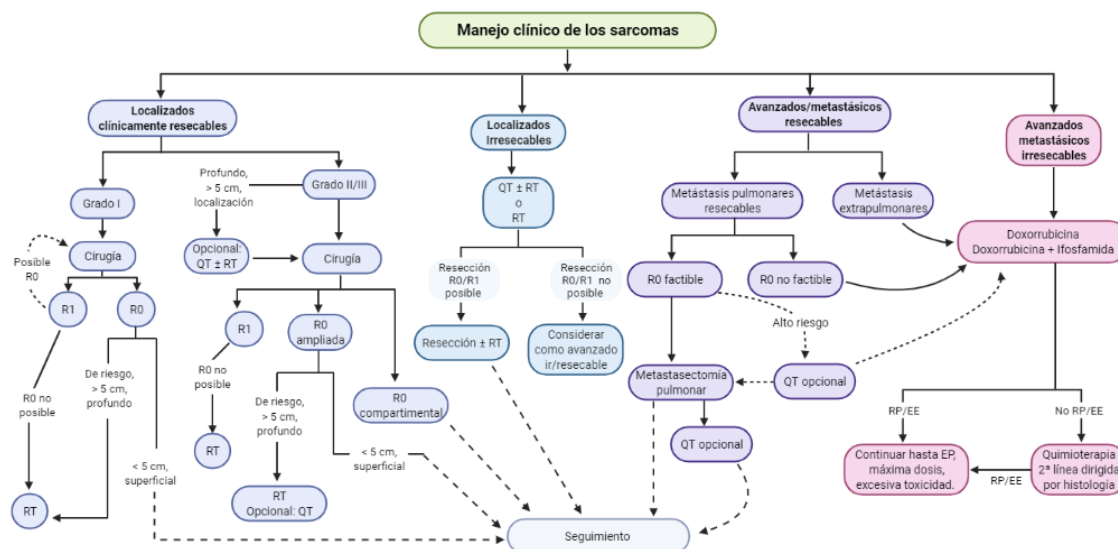
Si una primera línea con antraciclinas (con o sin ifosfamida o dacarbazina) no es capaz de controlar la enfermedad, es decir la enfermedad progresa, se aplica una segunda línea de tratamiento que se orientará en función de la histología:

- Tratamiento con ifosfamida si el paciente no había progresado previamente a dicho fármaco o si había respondido bien a él.
- Trabectedina se ha establecido como tratamiento en segunda o posteriores líneas, además de por su efecto antitumoral, por su toxicidad no acumulativa y manejable. La trabectedina es más activa en el subgrupo de los L-sarcomas, especialmente en LPS mixoide. Últimamente, su combinación con radioterapia ha demostrado igualmente buenos resultados clínicos (39-41). En el ensayo fase II (NCT02275286, GEIS-37), la combinación de trabectedina más radioterapia mostró una tasa de respuesta global del 72% de acuerdo con criterios RECIST en pacientes con SPB avanzado o metastásico en primera línea de tratamiento (41). En una serie retrospectiva de 40 pacientes pretratados de un centro de referencia en sarcomas, la SLP y la SG fueron de 7,5 y 23,5 meses respectivamente con un índice de modulación del crecimiento tumoral (marcador subrogado de eficacia) de 1,42 y de 1,33 en los pacientes en los que además asociaban una SG más larga (52,1 meses) (42).
- Pazopanib es otro de los fármacos que se han introducido en los últimos años entre las segundas líneas en SPB ya que en un estudio fase III frente a placebo

la SLP aumentó significativamente (4,6 vs 1,6 meses) en sarcomas no adipocíticos (no incluye LPS) (43). Una vez aprobado su uso, pazopanib se ha estudiado recientemente en tumor fibroso solitario (TFS), donde el 51% de los pacientes del subtipo maligno de esta histología respondieron al tratamiento (44) y el 58% de los pacientes de la cohorte de TFS típico mostraron respuesta según los criterios establecidos (45). Además, ha mostrado actividad en subtipos vasculares de SPB como condrosarcoma mixoide extraesquelético, angiosarcoma y hemangioendelioma epitelioides (46, 47). Se ha estudiado también su uso en primera línea en pacientes que no pueden recibir QT citotóxica, mostrando beneficio clínico en estos pacientes (48).

- Gemcitabina es usada ampliamente en segundas líneas de SPB tanto en monoterapia como en combinación con docetaxel (49), aumentando tanto la SLP como la SG y, además, mostrando ambas aproximaciones un incremento del 40% en la SLP en LMS tanto uterinos como no uterinos (50). Esta combinación, sin embargo, ha sido testada en primera línea frente a doxorubicina sin observarse beneficio alguno, quedando doxorubicina como tratamiento estándar en primera línea (51). En España, la combinación más utilizada es gemcitabina más dacarbazina, que presentó una mejora en la SLP y SG mayor que dacarbazina por sí sola en un ensayo fase II randomizado en pacientes de SPB avanzado (52, 53).
- Dacarbazina ha mostrado actividad en SPB no solo en combinación sino también en monoterapia. En comparación con Trabectedina, demostró una menor eficacia que dicho fármaco en LPS/LMS avanzados, pero el análisis final de SG no mostró superioridad de trabectedina sino un resultado similar entre ambos fármacos en dichos subtipos (39, 54).
- Regorafenib ha demostrado actividad antitumoral frente a sarcomas no adipocíticos previamente tratados con antraciclinas y pazopanib, en comparación con placebo (SLP de 2,1 meses frente a 1,1 meses) (55, 56) aunque aún no se ha aprobado por la FDA.
- Eribulina está aprobada para su uso en LPS en segundas líneas de tratamiento y en un estudio fase III demostró ventajas en supervivencia respecto a dacarbazina en liposarcomas (57).

Además de tratamiento sistémico, los pacientes metastásicos o con enfermedad avanzada, pueden recibir RT para la reducción de las lesiones o el alivio paliativo de posibles metástasis óseas (Figura 4).



**Figura 4: Esquema del manejo clínico de los sarcomas de partes blandas en diferentes estadios de la enfermedad.** EE: enfermedad estable; EP: enfermedad progresiva; QT: quimioterapia; R1: resección R1 (con bordes infiltrados); R0: resección R0 (bordes libres de tumor); RP: resección parcial; RT: radioterapia. Figura creada con BioRender (Biorender.com)

#### 4. Multirresistencia a fármacos

A pesar del esfuerzo realizado en las últimas décadas en la búsqueda de nuevos fármacos para primera línea de tratamiento de pacientes con SPB avanzados o metastásicos, el estándar de tratamiento para estos tumores sigue siendo doxorubicina en monoterapia o en combinación con ifosfamida, o dacarbazina (36). Las cifras de eficacia en cuanto a respuesta, aun así, son bajas para la poliquimioterapia, indicándonos que puede haber mecanismos de resistencia a drogas que estén limitando el efecto citotóxico de estos fármacos.

La resistencia a múltiples fármacos o multirresistencia a fármacos (MDR, *multidrug resistance*, en inglés) es la capacidad que tienen las células cancerosas de resistir a múltiples fármacos quimioterapéuticos con diferentes estructuras, dianas o mecanismos de acción. Esta resistencia puede ser intrínseca, es decir, que en la exposición del tumor a dichos fármacos haya células del tumor menos sensibles al tratamiento que otras, existiendo una heterogeneidad tumoral capaz de repoblar una masa tumoral que sea resistente a la terapia. La otra opción es que la multirresistencia sea adquirida, en otras palabras, el tumor adquiere nuevos mecanismos de resistencia o incrementa la función de los que poseía contra el efecto de la quimioterapia. (58).

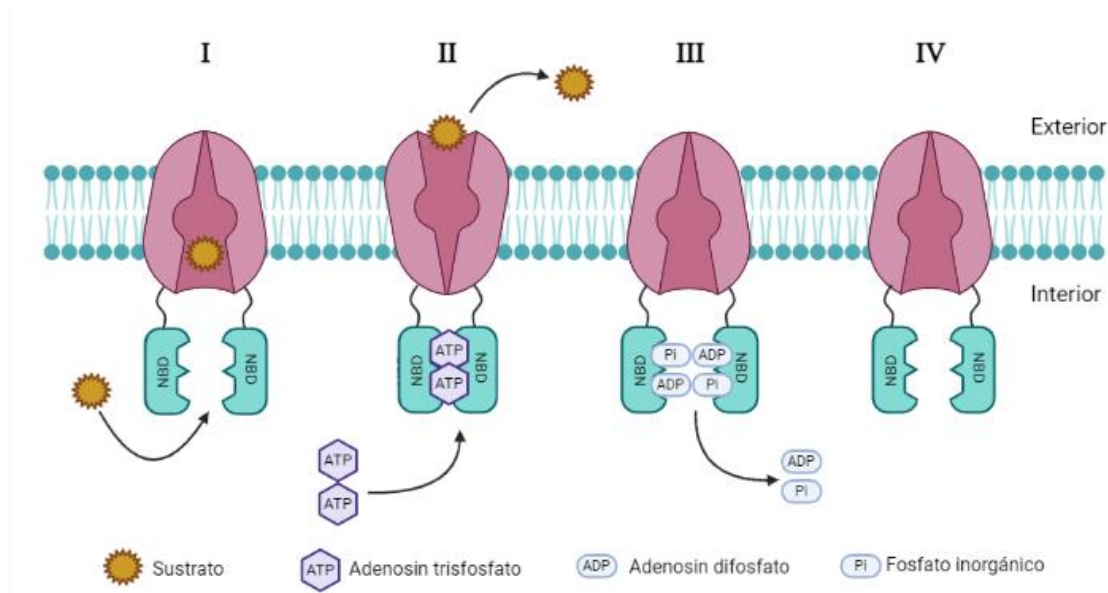
La resistencia a fármacos se divide en tres grandes subtipos, con base en diferentes aspectos: puede ser cinética, ya que tumores con un bajo índice mitótico pueden ser insensibles a la terapia; farmacológica, por la localización del tumor en sitios anatómicos

protegidos por sistemas fisiológicos de defensa o bioquímica (59). Esta última puede tener su origen en uno o varios de los siguientes procesos: 1) el aumento de eflujo de las drogas por transportadores de membrana (transportadores ABC, del inglés *ATP-Binding Cassette*), 2) una disminución en la absorción de fármacos por los transportadores de solutos, 3) un metabolismo de la droga mejorado, 4) un bloqueo de las vías de señalización apoptóticas, 5) cambios en la regulación génica, 6) mutaciones en las dianas de los fármacos, o activación retroalimentada de otras dianas o vías de señalización y 7) quimiorresistencia inducida por cambios en el microambiente. Uno de los mecanismos más estudiados y con más peso dentro de la MDR es el mediado por la sobreexpresión de proteínas ABC, siendo P-gp (Glicoproteína p), MRP-1 (Proteína de farmacorresistencia múltiple 1) y BCRP (Proteína de resistencia al cáncer de mama) los transportadores más reconocidos, asociados a ella (60). Elucidar los mecanismos subyacentes a la multirresistencia a fármacos sigue siendo un desafío al que enfrentarse para mejorar el efecto terapéutico de los fármacos, tanto en monoterapia como en regímenes de combinación.

#### **4.1. Transportadores ABC: estructura y transporte**

Los transportadores ABC son una superfamilia conservada de proteínas de membrana que se asocian a la multirresistencia a fármacos. Se han identificado un total de 48 genes subclasificados en 7 familias de acuerdo con su organización estructural y sus secuencias homólogas. Son proteínas con funciones fisiológicas entre las que destacan la eliminación de moléculas endógenas y xenobióticos a través de las membranas, detoxificación, mantenimiento del balance antioxidante y la presentación de antígeno. La estructura general de estos transportadores contiene dominios de unión a nucleótidos (NBD: *nucleotide binding domain*) y dominios transmembrana (DTM, en inglés llamados MSD: *membrane spanning domain*). Los NBDs cuentan con 3 motivos altamente conservados denominados Walker A, B y C, siendo este último exclusivo de la superfamilia ABC (61). El modelo de interruptor ATP, del inglés "*ATP-switch model*" es el modelo propuesto para explicar el mecanismo de transporte de los sustratos de estas proteínas, en concreto procedemos a describir el caso de MRP-1. De acuerdo con el modelo, los dominios de unión a nucleótidos se alternan entre posición abierta y cerrada, resultando dicho movimiento en la traslocación del ligando. El transporte se inicia con la unión del sustrato a los dominios transmembrana en la conformación abierta de NBD, lo que incrementa la afinidad y la unión de ATP. En la conformación cerrada, el dímero NBD tiene unidas dos moléculas de ATP, a los bolsillos Walker A y B, formando un bolsillo nucleotídico, produciéndose un cambio conformacional en los

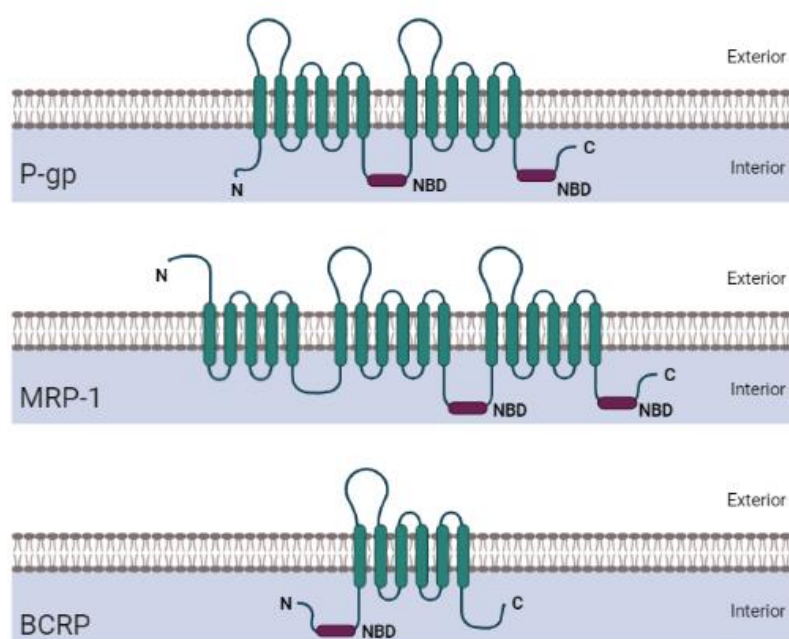
dominios transmembrana que da lugar al comienzo del transporte del sustrato. Se hidroliza el ATP y el transportador vuelve a su estado basal tras liberar el fosfato inorgánico y la molécula de adenosin difosfato (62) (Figura 5).



**Figura 5: Modelo de transporte de sustratos del transportador MRP-1.** Figura creada con Biorender (Biorender.com).

Las 7 subfamilias de transportadores ABC se clasifican de la A-G. La subfamilia ABCA consta de 13 miembros, de los cuales son todos exportadores menos *ABCA4*. Están implicados en el tráfico de membrana y colesterol, habiendo sido relacionados recientemente con la resistencia a fármacos (63). La subfamilia B se compone tanto de transportadores completos (*ABCB1,4,5,11*) como de medios transportadores (*ABCB2,3,6-10*), en función de los dominios presentes en su estructura, siendo el más conocido *ABCB1* (gen codificante de P-gp), asociado a progresión tumoral y resistencia a drogas. La subfamilia C cuenta con 12 miembros con funciones como el transporte de iones, eflujo de toxinas y receptores de la superficie celular. En general se conoce poco de su estructura y *ABCC1-6* y *ABCC10-12* se asocian a MDR. La subfamilia D se compone de 4 miembros, los cuales no están caracterizados estructuralmente. No existen muchas evidencias de su relación con cáncer y son medios transportadores. Las subfamilias E y F se caracterizan por ser proteínas solubles, sumando entre ambas familias 4 miembros. Por último, la subfamilia G se compone de 5 proteínas de las cuales *ABCG1* está implicada en el transporte de colesterol, *ABCG2* se relaciona con la MDR, *ABCG4* se expresa en el sistema nervioso central y *ABCG5* y *ABCG8* forman un heterodímero (64, 65). Los transportadores más estudiados y aquellos que la literatura relaciona con más frecuencia con la MDR son MRP-1/*ABCC1*, P-gp/*ABCB1* y BCRP/*ABCG2* (66-68).

MRP-1 es una proteína de 190 kilodaltons (kDa) que se expresa en diversos tejidos como pulmón, riñón, músculo esquelético y cardíaco, testículo y en tejidos embrionarios como la placenta (69). Su localización en la membrana celular suele ser basolateral y en cuanto a su estructura, MRP-1 contiene un dominio transmembrana extra en su N-terminal, compuesto de 5 segmentos, que es requerido para la eficiente retención del transportador en la superficie celular. P-gp, en cambio, tiene 170 kDa de peso molecular, compartiendo con MRP-1 solamente un 15% de identidad de secuencia. P-gp cuenta con 12 segmentos transmembrana y dos NBDs, localizándose en la parte apical de las células. Se encuentra altamente expresado en riñón, glándulas adrenales, hígado, páncreas, intestino, pulmón, barrera hematoencefálica y placenta. BCRP es una proteína más pequeña, de solamente 72 kDa y compuesta por 6 dominios transmembrana y 1 NBD, la mitad de la estructura de P-gp. También se localiza apicalmente y se expresa normalmente en placenta, mama, barrera hematoencefálica, hígado e intestino (70) (Figura 6). En cuanto a los sustratos de estas proteínas, P-gp y BCRP exportan tanto fármacos sin modificar como conjugados; P-gp en su mayoría compuestos anfipáticos y lípido-solubles neutros, mientras que BCRP, en cambio, transporta fármacos cargados positiva y negativamente, hidrofóbicos e hidrofílicos. MRP-1 exporta aniones inorgánicos conjugados a glutatión (GSH, g-Glu-Cys-Gly) como leucotrienos o prostaglandinas, ácido glucurónico y conjugados sulfatados (61, 71, 72). Esto tres transportadores tienen una especificidad de droga superpuesta, lo que muestra la red compleja en la que están envuelta los organismos para proteger de agentes



**Figura 6: Estructura de los transportadores ABC en la membrana celular.** Los dominios transmembrana se representan en verde. C: dominio C-terminal; N: dominio N-terminal, NBD: nucleotide binding domain o dominio de unión a nucleótidos

xenobióticos tóxicos. Asimismo, son capaces también de transportar sustratos fluorescentes, característica de gran utilidad a la hora de estudiar estas proteínas (73).

#### **4.2. Transportadores ABC en sarcomas y otros tumores.**

Son múltiples los estudios que muestran la expresión de las bombas ABC en sarcomas y su valor pronóstico. En algunos estudios la expresión de estas bombas se correlaciona con un alto grado histológico, siendo también esta expresión dependiente del histotipo (74, 75). En cuanto al transportador P-gp, se ha observado una alta expresión en tumores como colon riñón, hígado, mama, ovario y sarcomas previa exposición al tratamiento quimioterápico. Además, en algunos tumores, aunque la expresión sea baja al diagnóstico, esta aumenta tras la exposición a quimioterapia. En osteosarcoma, niveles altos de P-gp correlacionan con una SLP más corta y la inhibición de *ABCB1* con un ARN pequeño de interferencia (siARN) en un sistema de nanopartículas o con la tecnología CRISPR-Cas9 es capaz de revertir la resistencia a doxorubicina (76-78). Así mismo, P-gp se sobreexpresa en células madre tumorales de osteosarcoma, llevando a este linaje celular a ser más resistente a la terapia (79). En cuanto a BCRP, se expresa tumores especialmente del tracto digestivo, endometrio, pulmón y melanoma. En general, la alta expresión de ambas proteínas se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (61, 70, 80).

Centrando nuestro interés en MRP-1, son varias las evidencias que asocian MRP-1 con cáncer, en concreto con los SPBs. En SPB pediátricos, MRP-1 fue la proteína asociada a MDR más expresada en estos tumores no tratados y, junto con MDR3, aumentan su expresión tras la exposición a la quimioterapia (81). En tumores de la familia de los sarcomas de ewing, se ha observado como la expresión de MRP-1, a de ARN mensajero (ARNm) y a nivel de proteína en membrana se correlacionan con una peor SG, mientras que P-gp no correlacionó significativamente con supervivencia en este estudio (82). En otro estudio en GIST (tumores del estroma gastrointestinal), se analizó la expresión tanto de MRP-1 como de P-gp y la correlación entre dicha expresión y la respuesta a imatinib. Los resultados de este estudio han descrito a MRP-1 como la bomba de eflujo más frecuente en los GIST no gástricos y aunque imatinib es sustrato de estas proteínas, los resultados sugirieron que la expresión de estas no afectaba a la respuesta a imatinib (83). En una cohorte de SPB, la expresión de MRP-1, pero no de P-gp, tanto a nivel de proteína como de ARNm, ha sido asociada con un peor pronóstico en pacientes de alto riesgo localizados tratados con 3 vs 5 ciclos de epirubicina e ifosfamida (84). Por tanto, una estrategia clínica prometedora podría ser utilizar estas



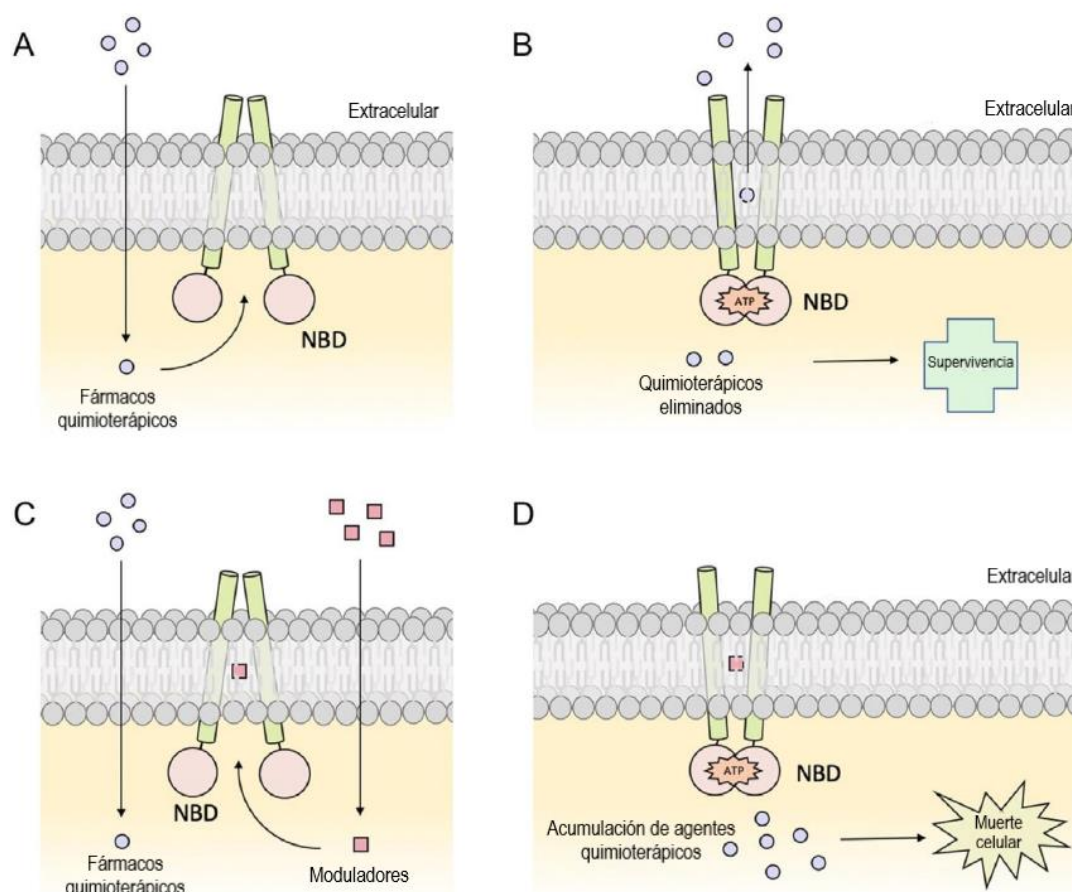
proteínas como marcador predictivo o de pronóstico, pudiendo además utilizarlo como diana terapéutica para disminuir la resistencia a la QT en sarcomas.

### 4.3. Estrategias de inhibición de MRP-1

Para contrarrestar la multirresistencia a fármacos y con el fin de aumentar la concentración intracelular de estos, se ha generado diferentes estrategias en los últimos años que se basan en: 1) el desarrollo de nuevos fármacos que no sean sustratos de los transportadores ABC; 2) la búsqueda de nuevos agentes o fármacos ya existentes para su combinación con agentes quimioterápicos que restauren la sensibilidad celular (Figura 7); 3) el transporte de los quimioterápicos en complejos lipídicos y 4) el uso de tecnología de ARN pequeños de interferencia para inhibir la expresión de estos genes como anticuerpos monoclonales para inhibir la acción de la proteína (65). En cuanto a los nuevos agentes para su uso combinado con otros fármacos, durante los últimos 30 años, se ha identificado un gran número de inhibidores de P-gp y, en menor número, de MRP-1. De hecho, múltiples inhibidores de MRP-1 derivan del desarrollo de inhibidores de P-gp (85). El primero de ellos fue verapamil, que en líneas resistentes a adriamicina, sin expresión de P-gp, también era capaz de revertir la resistencia ya que estas células estaban sobreexpresando MRP-1 (86). Otro grupo de inhibidores fueron las 1,4-dihidropiridinas y derivados de piridinas entre los que destacan nicarpidina, NIK-250 y PAK-104P, procurando potenciar la inhibición de MRP-1 y reducir la actividad bloqueante de los canales de  $Ca^{+2}$  propia de estos compuestos (87-89). Además, el poder inhibitorio aumentaba en combinación con el compuesto butionina sulfomixina, que elimina el GSH intracelular (90). Otro inhibidor destacado es Biricodar (VX-710), inhibidor de amplio espectro ya que es capaz de inhibir las 3 principales proteínas causantes de la MDR, algo poco común en estos inhibidores. Es capaz de retener un 90% de mitoxantrone a concentraciones de 2,5  $\mu$ M en células de leucemia resistentes a doxorubicina (91). Biricodar ha sido testado en un ensayo clínico fase I/II en combinación con doxorubicina en SPB localmente avanzados o metastásicos refractarios o resistentes a antraciclinas, mostrando estos, respuestas objetivas o estabilización de la enfermedad (salvo el subgrupo GIST que no mostró respuesta) (92).

Probenecid fue el primer compuesto estándar específico para MRP-1 que no deriva del conocimiento de P-gp y fue capaz de acumular daunorrubicina y calcein AM a concentraciones de 5 mM en células de pulmón resistentes a estos fármacos, además de disminuir la liberación de GSH (93). Este compuesto ha demostrado, también, ser capaz de inhibir el transporte de LTC<sub>4</sub> (leucotrieno C<sub>4</sub>) en células de leucemia a concentraciones de 10 mM (85, 94). Igualmente, se ha demostrado que concentraciones

de probenecid en el rango de 0,1 a 0,5 mM pueden revertir la resistencia a vincristina o daunorubicina en células de leucemia mieloide y carcinoma de pulmón de células pequeñas (95). Este es uno de los compuestos usados como control en múltiples comparaciones con otros inhibidores de MRP-1 que se han ido desarrollando a lo largo de los años.



**Figura 7: Mecanismo hipotético de los moduladores de transportadores ABC implicados en la MDR.** (A) Sin moduladores, los fármacos quimioterápicos se unen al bolsillo de unión de sustratos del transportador en los TMDs. (B) El sustrato y la molécula de ATP unidos al transportador provocan un cambio conformacional y los fármacos son expulsados al espacio extracelular, haciendo que la célula sobreviva debido a las bajas concentraciones intracelulares de fármaco. (C) Con moduladores, los agentes quimioterápicos no pueden unirse al bolsillo de unión de fármacos. (D) Los fármacos quimioterápicos se acumulan en el interior celular causando la muerte celular. Figura adaptada de Wang et al. (2021).

Otros inhibidores más recientes fueron desarrollados a partir de los sustratos intrínsecos de MRP-1. MK-571 (Verlukast) es un antagonista del LTC<sub>4</sub> que ha sido usado como un inhibidor estándar de MRP-1 (96). Ha sido testado en combinación con el inhibidor de P-gp verapamil para revertir la resistencia a inhibidores de histona deacetilasa (HDACs) en células de sarcoma de Ewing y osteosarcoma (97). También el ácido maslínico o el ácido oleanólico, ambos triterpenos pentacíclicos, se han testado en monoterapia o en combinación con doxorubicina, siendo capaces de sensibilizar las células a la QT, inhibiendo la actividad de MRP-1 pero no su expresión (98). Otro

inhibidor, esta vez testado en líneas de osteosarcoma, es CBT-1<sup>®</sup>, una bisbencilquinolona natural que inhibe *ABCB1/ABCC1*, que en combinación con doxorubicina revierte la resistencia a esta y a otros agentes quimioterápicos utilizados en segundas líneas en osteosarcoma como taxotere, etopósido o vinorelbina (99). Aún con el desarrollo de cientos de moléculas contra estos transportadores, los ensayos clínicos llevados a cabo hasta el momento con estos compuestos no han tenido resultados satisfactorios en términos de actividad. Por lo tanto, nuevos inhibidores más efectivos de los transportadores ABC son necesarios para incrementar la eficacia de la QT convencional.

#### **4.4. Inhibidores tirosina quinasa (TKIs) como inhibidores de MRP-1.**

Entre la plétora de compuestos que han mostrado actividad inhibitoria sobre las bombas de eflujo ABC, se encuentran los inhibidores tirosina quinasa (TKIs, del inglés *tyrosine kinase inhibitors*) y otros inhibidores de quinasas, los cuales han exhibido una mayor actividad de inhibición sobre MRP-1 y/o P-gp que otros compuestos como probenecid, verapamil y MK-571 (85). Las tirosinas quinasas (TKs, del inglés “tyrosine kinase”) tienen como función transferir el grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP al grupo hidroxilo de una serina, una treonina o una tirosina de los sustratos proteicos, siendo nodos con gran importancia dentro de complejas redes de señalización. Su desregulación se ha relacionado con el desarrollo y la progresión del cáncer, de ahí el desarrollo de múltiples moléculas inhibitoras de su función. Las TKs se dividen en receptores o no receptores, presentando, los receptores, una estructura con un dominio de unión de ligando extracelular, un dominio transmembrana y una región intracelular con el dominio catalítico TK (100).

Los TKIs, por su parte, son compuestos capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su bajo peso molecular y a su naturaleza orgánica y fueron diseñados para bloquear los sitios de unión de ATP de las TKs (101). Son fármacos cuya administración es oral y están aprobados por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) como terapia contra el cáncer y contra la diabetes, inflamación y otras enfermedades. Además de su función canónica, se ha descrito que actúan como inhibidores de transportadores ABC, bloqueando la función de eflujo de estos directamente en vez de inhibir su expresión o localización. Son múltiples las evidencias que confirman el papel de diferentes TKIs sobre diferentes bombas de eflujo ABC en tumores sólidos, pero pocos los datos científicos en SPB (102-104). Algunos de los TKIs que han sido estudiados en sarcomas son los siguientes:

Imatinib es un TKI tipo BCR-ABddL utilizado para el tratamiento de algunos sarcomas como los GIST. (105) Imatinib fue capaz de inhibir el flujo de calcein AM en células HL60/ADR y, además, su combinación con celecoxib, ambas a concentraciones de 10  $\mu$ M, bajaba la expresión de MRP-1 (106, 107).

Nilotinib es un inhibidor de segunda generación de BCR-ABL más potente y selectivo que imatinib. En líneas celulares de sarcoma mostró sinergia con doxorubicina (al contrario que imatinib), observándose un incremento de la apoptosis, un descenso significativo de la proliferación celular y un incremento de CFDA (sustrato específico de MRP-1) de más de 11 veces respecto a la acumulación generada por probenecid, en concentraciones entre 1-10  $\mu$ M (108). Además, un ensayo en fase I/II del Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS) que testaba la combinación del inhibidor MRP-1/P-gp, nilotinib, como co-adyuvante del tratamiento con doxorubicina mostró que la combinación es factible en humanos y que aparentemente no agrega toxicidad sustancial en comparación a doxorubicina en monoterapia (109). Los subtipos de SPB elegidos fueron LPS retroperitoneal, LMS y condrosarcoma de alto grado metastásico o irresecable, que recibieron 4 ciclos de 3 semanas de tratamiento donde se administraba Nilotinib a 400 mg/12 horas del día 1 al 6 del ciclo y doxorubicina hasta en tres dosis diferentes (60, 65 y 70 mg/m<sup>2</sup>) en el día 5 de cada ciclo. Se observó una inhibición biológica de la expresión de MRP-1 con el esquema planteado (109). Nilotinib también es capaz de inhibir la multirresistencia a fármacos, especialmente la mediada por *ABCB1* y *ABCG2*, en concentraciones entre 2,5 y 5  $\mu$ M (110).

Por otra parte, otros TKIs de desarrollo más reciente han demostrado capacidad de bloquear las bombas de eflujo ABC. Entre ellos cabe destacar ripretinib, selumetinib y avapritinib. Ripretinib (DCC-2618) es un TKI de tipo II para el que está aprobado su uso clínico en el tratamiento de GIST. Ejerce su acción en el bolsillo interruptor (o *switch pocket*) del *loop* de activación. Inhibe KIT, PDGFR, DDR2, VEGFR2 y TIE2 con un IC<sub>50</sub> por debajo de 10 nM (111). Debido a su efecto inhibitorio en el bolsillo interruptor, hipotetizamos que puede tener una actividad similar bloqueando las bombas de eflujo de la MDR, como MRP-1.

Selumetinib (AZD6244) es un inhibidor de las quinasas MEK1/2. Su IC<sub>50</sub>, en un panel de 38 líneas de sarcomas de partes blandas, está en el rango de 10<sup>-6</sup> – 10<sup>-7</sup> M (112). Se ha relacionado con la MDR de diferentes formas: desactivando ERK fosforilado, bajando la expresión endógena de MRP-1, revirtiendo la sobre-regulación de MRP-1 y MRP-3 inducida por gemcitabina o doxorubicina e incrementando la acumulación intracelular

de doxorubicina en carcinoma hepatocelular a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  (113). En SPB, el potencial inhibitorio sobre la actividad de MRP-1 no ha sido testado.

Avapritinib (BLU-285) es un inhibidor selectivo de KIT y PDGFR que es activo en pacientes GIST con la mutación D842V (111). Está diseñado para inhibir la conformación activa de la región del *loop* de activación. También se ha descrito que avapritinib es capaz de revertir la multirresistencia por *ABCB1* y *ABCG2* en algunas líneas celulares de cáncer, en concentraciones entre 0,1 y 10  $\mu\text{M}$  (114).

Por tanto, como ya se ha evidenciado en otros tumores, una estrategia bastante prometedora es el hecho de combinar fármacos utilizados en SPB con inhibidores tirosina quinasa que ayuden a revertir la resistencia creada por los transportadores ABC en segundas líneas de tratamiento.

## **5. Eribulina como nuevo tratamiento en sarcomas**

Eribulina (Halaven®; Eisai Co., Tokyo, Japón) es un análogo sintético de halichondrina B, un compuesto natural extraído de la esponja marina *Halichondria okadai* que ha sido aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico y más recientemente para LPS metastásico que haya recibido régimen de antraciclinas con anterioridad (115, 116). A pesar de que la halinchondrina B tuvo prometedores efectos antitumorales, su estructura es compleja y las fuentes naturales limitadas por lo que en 1992 se sintetizaron sintéticamente múltiples análogos, entre ellos, eribulina (117).

### **5.1. Eribulina y su papel como agente antimicrotúbulo**

Eribulina es un agente antimicrotúbulo y su principal mecanismo de acción está relacionado con su efecto en la parada del ciclo celular. Por consiguiente, procedemos a explicar brevemente este proceso celular, su regulación y la subsecuente mitosis.

#### **5.1.1. Ciclo celular y control del daño en el ADN.**

El ciclo celular es el proceso mediante el cual las células crecen y proliferan. Es un proceso ubicuo y complejo que consta de dos fases: la interfase y la fase M o también llamada mitosis, al final de la cual se produce la citocinesis o división del contenido celular. La interfase se divide a su vez en las fases G1, S y G2, cada una de ellas regulada por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK). En la fase G1, la célula se prepara para sintetizar el ADN, proceso que ocurre en la fase S, donde se dobla el material genético y, en fase G2, la célula se prepara para entrar en fase M, que es cuando la célula se dividirá en dos células hijas iguales. Además, existe otro estadio

denominado fase G0 o quiescente, donde las células no se encuentran en proliferación, es decir, no están ciclando, pero se encuentran potencialmente preparadas para ello (118, 119).

Las CDK son serina/treonina quinasas que, junto a las ciclinas, forman unos heterodímeros que se generan y se destruyen cíclicamente en las distintas fases del ciclo, siendo los complejos más importantes el CDK4 o 6 junto a la ciclina D durante la fase G1, el complejo CDK2/Ciclina E en la transición G1/S, el complejo CDK2/Ciclina A durante la fase S, CDK1/Ciclina A durante G2 y finalmente, el complejo CDK1/Ciclina B durante la mitosis. Son la maquinaria básica que controla el ciclo celular (118).

Además, de acuerdo con la definición de puntos de control (mecanismos de vigilancia que actúan entre las fases del ciclo celular), podemos dividir los puntos de control de daño en el ADN en punto G1/S, S y G2/M (120). El punto de restricción R se da en la fase G1 tardía, se comprueba que el ADN no esté dañado y puede comenzar la replicación. El punto de control de la fase S solamente causa un retraso reversible y transitorio en la progresión del ciclo, ralentizando así la replicación del ADN y, en ella, participan las mismas proteínas efectoras que el punto de control G1/S.

En cuanto a la mitosis, se divide en profase, metafase, anafase y telofase basándose en el estado físico y reversible de los cromosomas y el huso mitótico. En la profase, los microtúbulos se organizan formando el huso mitótico y la cromatina se condensa en cromosomas, que en la metafase se unirán a los microtúbulos a través de los cinetocoros para alinearse formando la placa metafásica. En anafase, las cromátidas hermanas se separan y en telofase se descondensan, reapareciendo la membrana nuclear que había desaparecido en profase y comenzando la citocinesis o división de la célula para dar lugar a dos células hijas (121). Los microtúbulos son estructuras formadas por heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, llamados  $\alpha\beta$ -tubulina, dímeros de tubulina o simplemente tubulina. Se componen de 13 protofilamentos lineales que se asocian lateralmente en forma de tubo hueco. Su crecimiento se caracteriza por ser polarizado, con un crecimiento rápido por el extremo positivo con  $\beta$ -tubulina expuesta y un extremo negativo con  $\alpha$ -tubulina expuesta. Los microtúbulos presentan una característica denominada inestabilidad dinámica en la cual los extremos de los polímeros transitan aleatoriamente entre periodos de crecimiento y de acortamiento, ocurriendo este hecho principalmente en el extremo positivo de los microtúbulos (122).

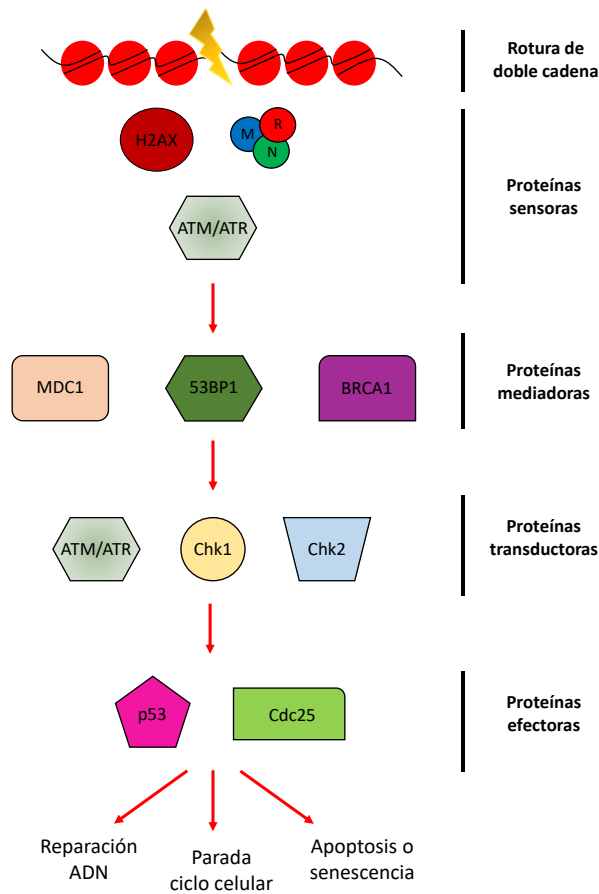
Estudios recientes han demostrado que las proteínas de daño en el ADN juegan un papel importante durante la mitosis. Desde el punto de vista de las neoplasias, el daño en el ADN puede ser: causa de la enfermedad, diana para el tratamiento de la

enfermedad y responsable también de las toxicidades que genera la terapia (123). La respuesta al daño en el ADN (o DDR: del inglés *DNA damage response*) es una compleja red de vías de señalización que coordina las reacciones celulares a las lesiones en el ADN (124).

Cuando se produce una lesión en el ADN, el sistema DDR induce una parada en el ciclo celular para evitar la replicación del ADN dañado y activa la cascada de señalización para reparar los sitios lesionados. Si el daño es irreparable, la célula desencadena señales que la llevan a muerte celular programada o apoptosis, pudiendo dicho sistema también inducir senescencia o parada irreversible del ciclo celular (125). El daño en el ADN puede producirse por procesos endógenos de la propia célula como pueden ser errores en la replicación, pérdida o cambio de bases nitrogenadas o por agentes exógenos como radiaciones ionizantes o ultravioletas y agentes químicos como los tratamientos usados para tratar el cáncer (126). Estos agentes, a su vez, pueden inducir lesiones de cadena sencilla o de doble cadena en el ADN, que se reparan de diferente manera. Nos centraremos en los mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DSBs: del inglés, *double-strand breaks*). Existen dos vías principales de reparación de doble cadena: la recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*) y la reparación por unión de extremos no homólogos NHEJ (del inglés: *nonhomologous end-joining*) (127).

Las dos vías principales de señalización de daño son las orquestadas por ATM-Chk2 (ATM: Atasia telangiectasia mutada y Chk2: quinasa *checkpoint 2*) para la HR y ATR-Chk1 (ATR: ATM y proteína relacionada con Rad-3 y Chk1: quinasa *checkpoint 1*), para la vía de reparación NHEJ. Las roturas de doble cadena son detectadas rápidamente por el complejo MRN (Mre11-Rad50-NBS1), el cual ayuda al reclutamiento y la activación de la quinasa ATM. Dicha proteína activada fosforila a diferentes sustratos como la histona H2AX en la serina 139 ( $\gamma$ -H2AX, utilizado como marcador epigenético), siendo este un paso esencial ya que será donde se ensamble el foco de reparación de daño. La histona  $\gamma$ -H2AX es reconocida por la proteína mediadora MDC1 (fosforilada por ATM), que permite una mayor acumulación del complejo MRN y amplifica la actividad de ATM y la formación de focos de  $\gamma$ -H2AX. MDC1 interacciona con la ubiquitina-ligasa RNF8, que recluta a las proteínas 53BP1 y BRCA1. En este punto, entran en juego las proteínas transductoras y efectoras de la respuesta a daño. Si se activa Chk2, se fosforila la fosfatasa Cdc25A, llevándola a degradación por el sistema ubiquitina. Esto provoca una acumulación de CDK2 haciendo que se pare la replicación. Si, por otro lado, ATM y Chk2 fosforilan a p53, se produce la transcripción

de p21<sup>Waf-1/Cip1</sup> que inhibe a los complejos CDK2/Ciclina E y CDK4/Ciclina D, acumulándose las células en el punto de control de G1/S. (123, 128-130) (Figura 8).



**Figura 8: Proteínas implicadas en la reparación de roturas de doble cadena.** El daño es detectado por las proteínas sensoras, H2AX, el complejo MRN (Mre11-Rad50-NBS1) y ATM/ATR. La señal es transmitida a las proteínas transductoras (ATM/ATR, Chk1/2) a través de las proteínas mediadoras (MDC1, 53BP1 y BRCA1). Las quinasas transductoras fosforilan a las proteínas efectoras, encargadas de desencadenar la respuesta adecuada.

La vía ATR-Chk1 se activa, más bien, cuando la replicación se bloquea por daño producido, por ejemplo, por radiación UV. ATR (ATR: ATM y proteína relacionada con Rad-3), Rad17-RFC, el complejo 9-1-1 (Rad9 – Rad1 – Hus1) junto con la proteína A de la replicación (RPA) y la proteína de interacción con ATR (ATRIP) se unen y se activan por la interacción con TopBP1, fosforilando en varios residuos a Chk1. Éste, inhibe a Cdc25 y estimula Wee1 para mantener su activación, provocando una parada en G<sub>1</sub> (124, 129, 130).



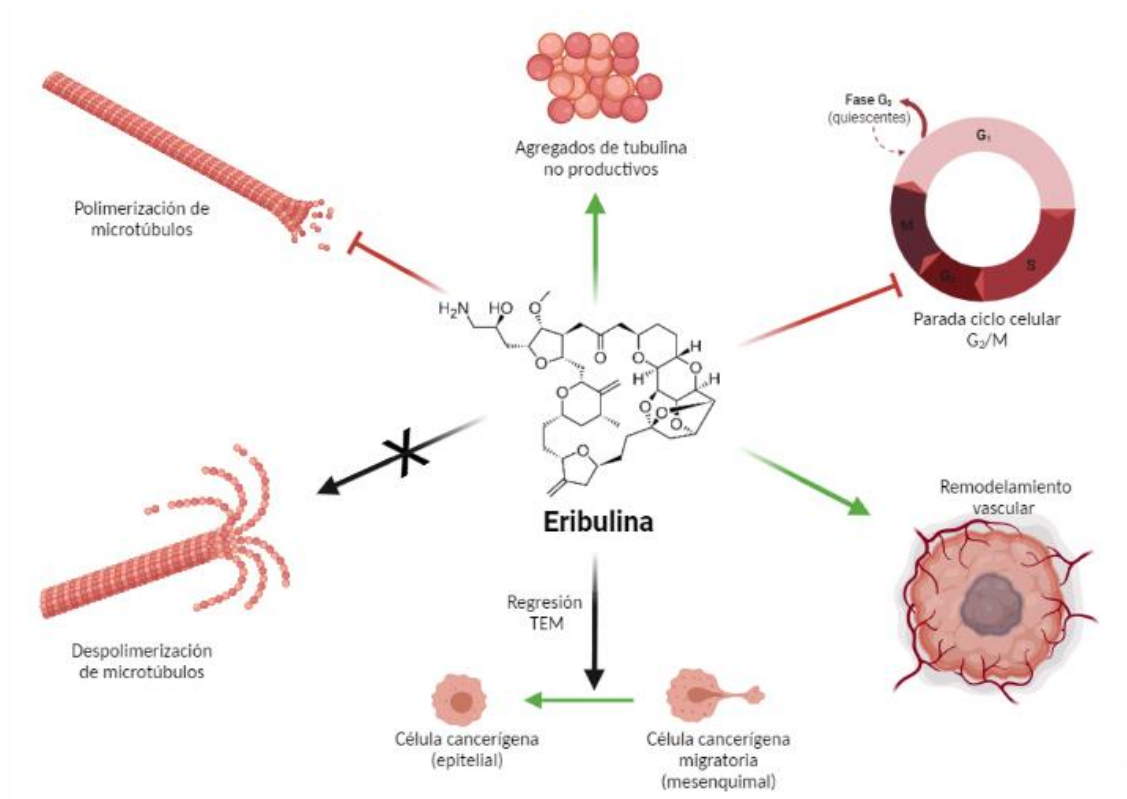
### 5.1.2. Mecanismo de acción principal de eribulina

El principal mecanismo de acción de eribulina se basa en la habilidad de alterar la polimerización de los microtúbulos, bloqueando la polimerización de más moléculas de tubulina mientras que la dinámica de acortamiento de los microtúbulos no se ve afectada, como ocurre con otros agentes antimicrotúbulos como los taxanos y los alcaloides de la vinca (131-133). Eribulina desorganiza el huso mitótico llevando a la célula a una parada del ciclo en fase G2/M (131) (Figura 9). Smith *et al.* han evidenciado la capacidad de eribulina para unirse con gran afinidad a las moléculas libres de tubulina (Kd 0,4  $\mu$ M), además de presentar una enorme afinidad por el extremo positivo de los microtúbulos ya que una sola molécula de eribulina es capaz de inhibir su crecimiento (134). En concreto, mediante modelaje molecular, se ha estudiado que la unión de eribulina se produce en el bolsillo donde se encuentran los loops H3 y H11 de la molécula de  $\beta$ -tubulina, de manera diferente a otros agentes antimicrotúbulos (135). Asimismo, en células de osteosarcoma, eribulina suprime la dinámica cinetocoro-microtúbulos siendo este el mecanismo por el cual eribulina bloquea la mitosis (136). Se ha demostrado, en líneas celulares de próstata y cáncer de mama, que el arresto mitótico producido por eribulina es irreversible y de prolongarse en el tiempo, acaba derivando en apoptosis celular, produciéndose primero una acumulación de eventos apoptóticos tempranos que acaban derivando en apoptosis tardía (131, 137). Esta parada mitótica se produce tras 12 horas de tratamiento y también 10 horas después de la retirada del fármaco, a concentraciones en torno a 10 nM (138). El bloqueo irreversible viene acompañado de una fosforilación, y por tanto, inactivación persistente de Bcl-2, perdiéndose la viabilidad celular y llevando a las células a apoptosis, vía la fragmentación de caspasas y de PARP (137, 138).

La apoptosis es un proceso de muerte celular controlada en el que participan gran variedad de proteínas que se retroalimentan positivamente para amplificar la señal y que el proceso se lleve a cabo adecuadamente. Se dan una serie de procesos en la célula como la condensación de la cromatina, la disminución del tamaño celular, la fragmentación nuclear y citoplasmática y la exposición al exterior celular de marcadores como la fosfatidilserina, que será reconocida por los fagocitos. Existen dos rutas que interactúan juntas: la extrínseca o de receptores de muerte, que es inducida por estrés celular y la intrínseca o mitocondrial regulada por la familia Bcl-2. Ambas convergen en la fase ejecutora que comienza con el procesamiento de la caspasa-3 (139, 140). Se ha descrito que el tratamiento con eribulina provoca una apoptosis parcialmente dependiente de caspasas y siempre tras la parada mitótica irreversible (141, 142).

## 5.2. Otros mecanismos de acción de eribulina en el microambiente tumoral.

Además de su efecto citotóxico y como agente antimicrotúbulo, eribulina presenta otras características interesantes como terapia contra el cáncer debido a sus funciones que regulan el remodelamiento vascular (143) (Figura 9). *In vitro*, eribulina inhibe la angiogénesis dirigida por el endotelio y los pericitos, reduciendo así el número de redes capilares en co-cultivos de células endoteliales y pericitos (144, 145) e, *in vivo* reduce la expresión de genes asociados a la angiogénesis, incluyendo algunos involucrados con el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), con las vías de señalización Wnt, Notch y Ephrin así como genes relacionados con el fenotipo mesenquimal (146). Es conocido que en el nicho tumoral la vasculatura es anormal, favoreciendo que se cree un ambiente hipóxico en el que la perfusión es deficiente. Sin embargo, eribulina incrementa la densidad de microvasos como se ha observado en modelos de cáncer de mama y LMS, causando la remodelación de la vasculatura del tumor e incrementando la perfusión tumoral (146, 147). Actúa, por tanto, como un modulador del microambiente, ya que también incrementa el número de células inmunes CD11b-positivas y de *natural killers* (143).



**Figura 9: Mecanismos de acción de eribulina.** Las flechas verdes indican los procesos potenciados por eribulina y las rojas los procesos que detiene. TEM: transición epitelio-mesénquima. Figura creada con BioRender.com.

Adicionalmente, eribulina es capaz de revertir la transición epitelio-mesénquima (Figura 9) y disminuir la capacidad de las células para migrar, invadir y metastatizar *in vitro* en cáncer de mama triple negativo (148, 149). En sarcoma de células claras también se ha demostrado la inhibición de la proliferación y diferenciación del tumor gracias al efecto de eribulina sobre las células tumorales y la reoxigenación en los xenoinjertos tumorales (150). En experimentos *in vivo* con modelos ortotópicos derivados de pacientes, se ha visto como eribulina es capaz de reducir el tamaño tumoral con respecto al inicial, tanto en LPS desdiferenciado como en sarcoma de Ewing y osteosarcoma, todos ellos resistentes a doxorubicina (151-153). De igual modo, es capaz de aumentar la saturación de oxígeno en tumores de pacientes de cáncer de mama, bajando las concentraciones plasmáticas de TGF- $\beta$ 1 (154).

### 5.3. Eribulina en el contexto clínico.

Tras el ensayo fase 3 randomizado en cáncer de mama metastásico (EMBRACE), en el que los pacientes eran asignados en proporción 2:1 a eribulina o a cualquier otro tratamiento disponible, se aprobó eribulina en dicho contexto ya que mostró una mejora significativa en la SG de estas pacientes previamente tratadas (115). Posteriormente se ha comparado con capecitabina, no obteniéndose diferencias en términos de SLP, SG o ORR (del inglés, “*overall response rate*”, tasa de respuestas totales) (155). Eribulina se ha probado también en combinación con gemcitabina frente a paclitaxel combinado también con gemcitabina en primera línea de tratamiento de cáncer de mama metastásico HER-2 negativo, mostrando ambos grupos resultados similares en cuanto a SLP, pero menos toxicidad en la combinación con eribulina (156, 157).

En SPB en un ensayo clínico en fase 3 randomizado, multicéntrico, Schöffski *et al.* reportaron que eribulina mostró resultados prometedores aumentando la SG en comparación con dacarbazina en LPS y LMS previamente tratados (57). En posteriores análisis por subtipo histológico, se observó una mayor SG en pacientes con los tres subtipos histológicos de LPS del ensayo, siendo el subtipo pleomórfico el que muestra una mayor SG (22,2 vs 6,7 meses) (158). En el caso del subgrupo de LMS, tanto la SG como la SLP era comparable entre los pacientes tratados con eribulina y con dacarbazina (159). También existe una diferencia dependiendo del sitio anatómico del tumor primario, siendo eribulina más efectiva en LMS no uterinos (159). Por tanto, esto llevó a la autorización de su uso solamente para LPS localmente avanzado o metastásico y no para LMS. Diferentes casos clínicos confirman la efectividad de eribulina, consiguiendo respuestas parciales y estabilización de la enfermedad en LMS

uterino avanzado y en los diferentes subtipos de LPS con una relativa baja toxicidad (160).

#### 5.4. El potencial de combinación de eribulina

Son numerosos los estudios que apoyan combinaciones de eribulina con otros fármacos citotóxicos debido a sus diversos mecanismos de acción. En modelos xenoinjertados derivados de pacientes (PDX, del inglés "*Patient-derived xenografts*") de diferentes tumores sólidos se han testado diferentes combinaciones de eribulina con agentes citotóxicos como capecitabina, cisplatino, carboplatino, doxorrubicina y gemcitabina, mostrando estas combinaciones una sinergia y una mayor actividad preclínica que los fármacos en monoterapia (161).

Gemcitabina (Gemzar®; Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN, USA) [2'-deoxy-2', 2'-difluorocitidina monohidrocloruro (beta-isómero); dFdC] es un análogo de deoxicitidina usado en el tratamiento de un amplio espectro de tumores, incluyendo los SPB (162). Gemcitabina, en su forma trifosforilada, actúa como un sustrato competitivo de la deoxicitidina trifosfato, incorporándose al ADN durante la replicación, inhibiendo la elongación del ADN y causando una fuerte parada del ciclo en fase G1, incrementando la muerte celular por apoptosis (163). Gemcitabina, en el escenario metastásico de los SPB, se administra tanto en monoterapia como en combinación con docetaxel, mostrando una especial actividad en LMS (164). Adicionalmente, otros estudios clínicos han testado la combinación de gemcitabina con otros agentes citotóxicos como dacarbazina (53), paclitaxel (165), sirolimus (166) y pazopanib (167) mostrando una actividad sinérgica y confirmando la utilidad de gemcitabina en esta entidad. De hecho, un ensayo clínico fase II de gemcitabina y docetaxel en combinación con el fármaco antiangiogénico bevacizumab mostró resultados prometedores en pacientes con SPB (49% de respuesta parcial y una SLP de 3 meses en el 76% de los pacientes) pero, estos resultados no fueron extrapolables a la fase III en uLMS metastásico, donde no mejoró la SLP, SG ni la ORR (168, 169). Estos resultados sugieren que el uso de drogas antiangiogénicas en combinación con gemcitabina necesita más investigación en el campo de los SPBs. Sin embargo, los tumores desarrollan mecanismos de resistencia que pueden justificar el limitado efecto terapéutico de gemcitabina y, por tanto, se requieren urgentemente nuevas estrategias para aumentar la gemcitabina intracelular y potenciar así su actividad en SPB (162). En un modelo de PDOX (del inglés, "*Patient-derived orthotopic xenograft*"), la combinación de gemcitabina más docetaxel no produjo una respuesta tumoral, mientras que eribulina en monoterapia causa una importante regresión tumoral (153). Además, se ha estudiado la implicación de la vía Wnt/ $\beta$ -

catenina y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la adquisición de la resistencia a gemcitabina. Una activación de la primera y una inhibición de la segunda revertirían estos fenómenos de resistencia (170, 171). Otra aproximación estudiada recientemente es la inhibición de Chk1 en SPBs con deficiencias en p53, ya que se ha demostrado que esto los hace más sensibles a fármacos que paran el ciclo en G1 como es el caso de gemcitabina (172). Una estrategia prometedora es la combinación de gemcitabina con drogas antineoplásicas que son capaces de incrementar la perfusión tumoral y facilitar su acumulación, liberación y distribución intratumoral. La resistencia a gemcitabina sigue siendo un importante desafío que superar y la combinación con eribulina podría ser una opción por estudiar en dicho campo.

## **Hipótesis y objetivos**



El objetivo principal de esta tesis doctoral es la búsqueda de nuevas combinaciones farmacológicas, que reviertan la resistencia a la quimioterapia, en el tratamiento, en primera línea o en líneas consecutivas de sarcomas de partes blandas avanzados. Para alcanzarlo se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el valor pronóstico y/o predictivo de la bomba de eflujo MRP-1 en muestras tumorales de pacientes tratados con antraciclinas e ifosfamida.
2. Caracterizar la actividad de diferentes inhibidores de MRP-1 y el efecto de su combinación con los agentes quimioterápicos doxorrubicina y palifosfamida en modelos *in vitro* de SPB.
3. Estudiar la actividad de la combinación de eribulina y gemcitabina en modelos *in vitro* de leiomiomas y liposarcomas y sus mecanismos moleculares asociados.
4. Testar la eficacia y la toxicidad de la combinación de eribulina y gemcitabina en modelos *in vivo* de leiomiomas y liposarcoma.





## **Materiales y métodos**



## 1. Cultivos celulares

### 1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas se describen en la tabla 1. Todas ellas tienen un crecimiento adherente y su especie de procedencia es *Homo sapiens*:

**Tabla 1: Líneas celulares utilizadas**

Línea celular	Tipo celular	Medio de cultivo	Origen
SK-UT-1	Leiomioma uterino	DMEM	ATCC (HTB-114™)
CP0024	Leiomioma	RPMI	Cultivo primario
93T449	Liposarcoma bien diferenciado	RPMI	ATCC (CRL-3043™)
94T778	Liposarcoma bien diferenciado	RPMI	ATCC (CRL-3044™)
SW872	Liposarcoma	L-15	ATCC (HTB-92™)
SW982	Sarcoma sinovial	L-15	ATCC (HTB-93™)
ICP060	Tumor maligno de vaina nerviosa periférica	RPMI	Cultivo primario

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA, USA); DMEM: del inglés *Dubelcco's Modified Eagle Medium*; F-10: del inglés *F-10 Nutrient Mix (Ham)*; L-15: del inglés *Leibovitz's L-15 Medium*; RPMI: del inglés; del inglés *Roswell Park Memorial Institute*.

### 1.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares

Las líneas celulares CP0024, 93T449, ICP60 y 94T778 se cultivaron en medio RPMI (Gibco™, Fisher Scientific SL., Waltham, Massachusetts, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum* (suero fetal bovino), Gibco™), 1% de una solución que contiene 10 000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/ml (Sigma-Aldrich®, KGaA, Darmstadt, Alemania) y 1% de fungizona a 250 µg/ml (anfotericina B; Sigma-Aldrich®). La línea SK-UT-1 se cultivó en medio DMEM con glutamina estable (Gibco™) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®), 1% de fungizona a 250 µg/ml (anfotericina B; Sigma-Aldrich®), 1% de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich®), 0,1% de aminoácidos no esenciales (MEM: Non-essential Amino Acid Solution 100X, Sigma-Aldrich®) y 0,1% de solución HEPES 1M (Sigma-Aldrich®). Todas las líneas nombradas anteriormente fueron cultivadas en un incubador humidificado a 37°C y en una atmósfera al 5% CO<sub>2</sub>. Las líneas SW872 y SW982 se cultivaron en medio L-15 (Gibco™) suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de solución HEPES. Estas líneas celulares se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera al 0% CO<sub>2</sub>.

Todas las líneas celulares se cultivaron en placas de 10 cm (Falcon®, Corning, Arizona, USA) y en frasco de Roux de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc™ EasyFlask™ 75 cm<sup>2</sup> Nunclon™ Delta Surface, Fisher Scientific SL) y se subcultivaron en pases 1:2-1:10 cada 3-4 días

mediante tratamiento con tripsina/EDTA 0.05% (Sigma-Aldrich®). Todas las manipulaciones se hicieron en campana de flujo laminar de Clase II Bio-II-A (nivel de seguridad biológica 2; Telstar, Terrasa (Barcelona), España).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal con 10% de DMSO, previo paso por un tanque de isopropanol para una congelación lenta a -80°C. Para descongelar un vial de células, se sumergió en un baño con agua a 37°C durante 5 min, se centrifugó el contenido en 10 ml de medio y las células se resuspendieron en su medio de cultivo habitual.

## 2. Ensayos celulares

### 2.1. Ensayos de viabilidad celular

#### 2.1.1. Fármacos utilizados

En la tabla 2 se recogen los diferentes fármacos utilizados y el rango de concentración en el que se utilizaron. Fueron disueltos en DMSO para alcanzar la concentración stock y almacenados a -20/-80°C para su uso.

**Tabla 2: Fármacos utilizados**

Fármaco	Proveedor	Stock	Diluciones	Peso molecular (g/mol)
Doxorrubicina	Sigma-Aldrich®	10 mM	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-5</sup>	579,98
Palifosfamida	AdoqBioscience	1 mM	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-4</sup>	221,02
Eribulina	Eisai Farmacéutica	10 mM	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-7</sup>	729,9
Gemcitabina	Sigma-Aldrich®	10 mM	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-6</sup>	263,2

#### 2.1.2. Compuestos utilizados en la inhibición de MRP-1 y P-gp

En la tabla 3 se recogen los diferentes inhibidores y otros compuestos utilizados para la inhibición de las bombas MRP-1 y P-gp y el rango de concentración en el que se utilizaron.

**Tabla 3: Compuestos testados como inhibidores de MRP-1 y P-gp**

Compuesto inhibidor	Proveedor	Stock	Rango de dilución
Probenecid	Sigma-Aldrich®	100 mM	200 µM
MK-571	MedChemExpress	10 mM	1 µM
Nilotinib (NVP-AMN107-AA)	Sigma-Aldrich®	10 mM	1-10 µM

Ripretinib (DCC-2618)	MedChemExpress	10 mM	5-10 $\mu$ M
Selumetinib (AZD6244)	MedChemExpress	10 mM	5-10 $\mu$ M
Avapritinib (BLU-285)	MedChemExpress	10 mM	1-10 $\mu$ M

### 2.1.3. Cálculo de IC<sub>50</sub> en líneas celulares

Para la determinación del IC<sub>50</sub> (la concentración a la que un fármaco es capaz de inhibir un proceso biológico concreto en un 50%, en este caso la concentración de fármaco a la que se produce un 50% de muerte celular), se sembraron  $2 \times 10^3$  (SK-UT-1),  $2,5 \times 10^3$  (CP0024) y  $3 \times 10^3$  (93T499, IEC016 y SW872) células en placas de 96 pocillos. Se utilizaron concentraciones de doxorrubicina, palifosfamida, eribulina o gemcitabina en el rango de  $10^{-4}$  a  $10^{-11}$  M, según lo descrito en la literatura, calculando el IC<sub>50</sub> de dichos fármacos tras 72 horas de exposición al tratamiento. La viabilidad celular se midió usando *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt* (MTS) (Promega; Madison, WI, USA), midiendo la absorbancia a 490 nm en el lector de placa *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos fueron analizados con Prism 6.0 (GraphPad; San Diego, CA, USA).

### 2.1.4. Ensayos de viabilidad celular tras la combinación de 2 o más fármacos

Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos donde se sembraron  $2 \times 10^3$  células de SK-UT-1,  $2,5 \times 10^3$  de CP0024 o  $3 \times 10^3$  de 93T499. A las 24 horas, cuando las células alcanzaron una confluencia del 70%, fueron tratadas con los siguientes fármacos que, en base a los IC<sub>50</sub> calculados y con el objetivo de analizar si concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub> podrían ser efectivas en combinación con los TKIs, se ha decidido usar dos concentraciones por línea:

- SK-UT-1 fue tratada con 5 o 10  $\mu$ M de nilotinib o 5 o 10  $\mu$ M avapritinib en combinación con:
  - o 100 nM de doxorrubicina y 20  $\mu$ M de palifosfamida, estando estas concentraciones en el rango de sus IC<sub>50</sub>, a las que denominaremos altas concentraciones.
  - o 50 nM de doxorrubicina y 10  $\mu$ M de palifosfamida, estando estas concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub>, a las que denominaremos bajas concentraciones.

- CP0024 fue tratada con 5 o 10  $\mu\text{M}$  de nilotinib o 5 o 10  $\mu\text{M}$  avapritinib en combinación con:
  - o 50 nM de doxorrubicina y 150  $\mu\text{M}$  de palifosfamida, estando estas concentraciones en el rango de sus  $\text{IC}_{50}$ , a las que denominaremos altas concentraciones.
  - o 25 nM de doxorrubicina y 75  $\mu\text{M}$  de palifosfamida, estando estas concentraciones por debajo del  $\text{IC}_{50}$ , a las que denominaremos bajas concentraciones.

En el caso de los índices de combinación de eribulina y gemcitabina, las líneas celulares CP0024, 93T449, 94T778 y SK-UT-1 fueron tratadas con concentraciones crecientes de ambos fármacos (0,1; 1 y 10 nM) en proporción 1:1 y siguiendo diferentes secuencias (eribulina 24h previo a gemcitabina, gemcitabina 24 horas previo a eribulina y ambos fármacos de forma concomitante).

En ambos casos, tras 72 horas con los tratamientos farmacológicos correspondientes, se midió la viabilidad celular con MTS (Promega; Madison, WI, USA), midiendo la absorbancia a 490 nm en el lector de placa *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad). Los resultados obtenidos fueron analizados con Prism 6.0 (GraphPad; San Diego, CA, USA).

## 2.2. Ensayo clonogénico

Para estudiar la capacidad de las células de formar clones individuales, se sembraron  $0,5-1 \times 10^3$  células (SK-UT-1, CP0024 y 93T449) células en placas de 10 cm por triplicado, tras los correspondientes tratamientos. A los 7 (CP0024), 10 (SK-UT-1) o 12 (93T449) días se lavaron las placas con PBS 1X y se tiñeron con cristal violeta. Después de lavar las placas, se contaron manualmente.

## 3. Silenciamiento transitorio con ARN de interferencia

El ensayo de silenciamiento transitorio de *ABCC1* se realizó en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024. Se utilizaron *pools* para el silenciamiento del gen para *ABCC1* (*ON-TARGETplus SMARTpool ABCC1 siRNA* (L-007308-00-0005)) y un control negativo del silenciamiento (*ON-TARGETplus Non-Targeting Control Pool* (D-001810-10-05)) (GE Healthcare, Dharmacon, Inc., Colorado, USA). Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando lipofectamina (Lipofectamine™, *RNAiMAX transfection reagent* (Invitrogen™, Fisher Scientific SL), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con medio bajo de FBS (Opti-MEM™, Gibco™). Todos los siRNAs fueron utilizados a concentraciones de 15 nM. Se comprobó el silenciamiento génico a 24, 48 y 72 horas de la transfección. Las células fueron sometidas a los diferentes tratamientos tras 24 horas de silenciamiento.

#### 4. Ensayos con ARN

##### 4.1. Extracción y cuantificación de ARN

Las células fueron recogidas y centrifugadas en un tubo de 1,5 ml y se resuspendió en 1 ml de Trizol® (Invitrogen™, Fisher Scientific SL). Tras 5 minutos (min) de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo (Merck; Whitehouse Station, NJ, USA) y se homogeneizó la muestra. Tras 2 min de incubación a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 4°C 12 000 rpm (13 523 g) durante 15 min. En este punto, se pudieron distinguir 3 fases de acuerdo con las partículas que constituyen las células:

- i) una fase superior acuosa de ARN
- ii) una fase intermedia blanca de ADN
- iii) una fase roja inferior de proteínas

Las fases superiores de ARN se transfirieron a nuevos tubos a los que se les añadió 500 µl de isopropanol (Panreac AppliChem, ITW Reagents). Tras ello, las muestras fueron incubadas en hielo 10 min y nuevamente centrifugadas a 4°C 12 000 rpm (13 523 g) durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en 700 µl de etanol estéril (Panreac AppliChem, ITW Reagents) al 70% en agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato; (Ambion®-LifeTechnologies-Invitrogen; Paisley, UK).

La purificación del ARN se llevó a cabo con el kit de extracción *PureLink RNA Mini KIT* (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron los 700 µl de etanol ya resuspendidos a la columna y se centrifugó a 12 000 g (11 304 rpm) durante 15 segundos (s). Se descartó el eluido y se añadieron 700 µl de Wash Buffer I a la columna, centrifugando nuevamente a 12000 g (11 304 rpm) durante 15 s. Se descartó el eluido y se añadieron 500 µl de Wash Buffer II, centrifugando la columna a 12 000 g (11 304 rpm) durante 15 s, eliminando el eluido y volviendo a centrifugar la columna vacía durante 1 min a 12 000 g (11 304 rpm). Este último paso se repitió dos veces. Por último, se eluyó el ARN en 60 µl de agua DEPC, centrifugando la columna a 15 000 rpm (21 130 g) durante 2 min.

Para la cuantificación del ARN, las muestras se midieron en el espectrofotómetro NANODrop (NanoDrop One C, Fisher Scientific SL) y las ratios 260nm/280nm y 260nm/230nm fueron analizados y se buscó que sus valores estuvieran entre 1,8-2.

##### 4.2. Transcripción reversa a ADNc (RT-PCR)

La retrotranscripción de ARN a ADNc (ADN complementario) se llevó a cabo con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher



Scientific SL). Se añadió por reacción: 3 µl de 10X RT Buffer, 1,2 µl de dNTPs Mix 100 mM, 3 µl de 10X RT Random Primers, 0,75 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl), 6 µl de ARN normalizado a 40 ng/µl y hasta 30 µl de H<sub>2</sub>O. Las muestras fueron homogeneizadas y la reacción se llevó a cabo en el termociclador Thermal Cycler xp (Bioer) donde fueron sometidas a 25°C 10 min (unión de los cebadores al azar), seguidos de 120 min a 37°C (síntesis del cDNA) y 5 min a 85°C (inactivación de la enzima). Una vez finalizada la reacción se guardó el ADNc a -20°C hasta su uso.

#### 4.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La detección de cambios en la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) con ADNc procedente de la retrotranscripción reversa como material genético de partida (RT-qPCR). En placas de 384 pocillos (*MicroAmp® Optical 384-Well Reaction plate with barcode*; Applied Biosystems – Life Technologies), se cargaron 2 µl de ADNc y un mix que contiene 2,5 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, 5µl de TaqMan™ Universal PCR Master Mix 4304437 (Applied Biosystems – Life Technologies) y 0,5 µl de sonda *TaqMan™ Gene Expression Assay* (Applied Biosystems – Life Technologies). Las distintas sondas utilizadas se describen en la tabla 4.

**Tabla 4: Sondas TaqMan™ utilizadas**

GEN	Nombre del gen	Referencia
<i>ABCB1</i>	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1	Hs01067802_m1
<i>ABCC1</i>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1	Hs00219905_m1
<i>ABCG2</i>	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2	Hs01053790_m1
<i>B2M</i>	Beta-2-Microglobulin	Hs99999907_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Hs03929097_g1

La placa se centrifugó durante 1 min a 3 000 rpm (845 g) para eliminar posibles burbujas. La qPCR se realizó en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en un primer paso de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C para activar la polimerasa, 40 ciclos de 15 s a 95°C para la amplificación de la señal y 1 min a 60°C para recoger los datos de fluorescencia. El análisis se llevó a cabo mediante los softwares SDS y RQ Manager (Applied Biosystems). Se han evaluado los Ct del gen endógeno (*B2M* o *GAPDH*) y de los genes problema. Se utilizó la fórmula para  $2^{-\Delta Ct} = 2^{(Ct(\text{gen problema}) - Ct(B2M/GAPDH))}$  para normalizar la expresión del gen problema con el gen endógeno y *a posteriori* se relativizó este valor con el nivel endógeno más bajo o el control. Cada reacción se hizo por triplicado y se realizaron al

menos 3 experimentos independientes para cada gen analizado. Se introdujo una muestra de control negativo (sin ADNc) en cada experimento.

## 5. Ensayos con proteínas

### 5.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, se utilizó una solución de lisis constituida por buffer RIPA (*RadiolmmunoPrecipitation Assay buffer*) junto a un cocktail de inhibidores de proteasas, fosfatasas y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich®) en proporción 1:100. El buffer RIPA está compuesto de 1M Tris-HCl pH 8 (PanReac AppliChem, ITW Reagents), 0,5M EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Thermo Fisher Scientific SL), Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®), desoxicolato de sodio 10% (Sigma-Aldrich®), SDS 10% (dodecilsulfato sódico, Sigma-Aldrich®) y 3M NaCl (cloruro de sodio, Thermo Fisher Scientific SL).

Se añadieron 100-200 µL de la solución de lisis a los botones celulares, se incubaron en hielo 20 min y los restos de debris celular se centrifugaron 15 min a 15000 rpm (21130 g) a 4°C. El sobrenadante (extracto proteico) se guardó a -20°C.

### 5.2. Cuantificación de proteínas

Los extractos proteicos fueron cuantificados usando el método de Bradford (Bio-Rad). La recta de calibrado de la cuantificación se realizó con el Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set (Bio-Rad) añadiendo 2 µl de cada uno de los 7 puntos de concentración estándar (de 2 µg/ml a 0,125 µg/ml) a 198 µl del reactivo colorante de Bradford en una placa de 96 pocillos Microtiter Fondo PL B/U No Estéril (Deltalab, Barcelona, España). Dejamos desarrollar la reacción durante 5 min en oscuridad y medimos la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Extrapolamos las concentraciones de nuestras muestras de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer y ajustamos la concentración de nuestras muestras a 20-30 µg/µL con H<sub>2</sub>O DEPC.

### 5.3. Electroforesis y *Western-blot*

Se utilizó buffer de carga Laemmli 5X a concentración final 1X para una concentración de proteínas de 20 µg. Este buffer fue preparado en un volumen final de 20 ml (5X) con 2 g de SDS, 5 ml de β-mercaptoetanol, 10 ml de glicerol, 5 mg de azul de bromofenol y 6 ml de 1M Tris-Hcl pH 6,8. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma-Aldrich®. Las muestras se desnaturalizaron 5 min a 95°C en el termobloque Thermomixer C (Eppendorf, Fisher Scientific).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con sodio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE). Se prepararon los geles de acrilamida (*running*) siguiendo la siguiente tabla según el peso molecular de la proteína

a estudiar en cada caso. Para las proteínas grandes (>100 kDa) se utilizaron geles al 6% de acrilamida, para proteínas medianas (37-100 kDa) geles al 8-10% de acrilamida y para proteínas pequeñas (<37 kDa) geles al 15% de acrilamida. En todos los casos, los geles preparados eran de 1,5 mm de grosor. Los geles de *running* se prepararon según la siguiente receta:

**Tabla 5: Receta de los geles *running* de electroforesis**

	<b>6%</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,3	4,6	4	3,3	2,2
<b>Acrilamida 30%</b>	2	2,7	3,3	4	5
<b>Tris HCl pH 8,8</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>SDS 10% (μl)</b>	100	100	100	100	100
<b>APS 10% (μl)</b>	100	100	100	100	100
<b>TEMED (μl)</b>	8	6	4	4	4

Los geles de *stacking* fueron preparados al 4% de acrilamida siguiendo la receta que continúa:

**Tabla 6: Receta de los geles *stacking* de electroforesis**

<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,62
<b>Acrilamida 30%</b>	0,65
<b>Tris HCl pH 6,8</b>	0,625
<b>SDS 10% (μl)</b>	50
<b>APS 10% (μl)</b>	50
<b>TEMED (μl)</b>	5

Seguidamente, se cargaron las muestras desnaturalizadas en los geles de acrilamida. Como marcador de peso molecular se utilizó 5 μl de Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad), que está compuesto por una mezcla de 10 proteínas recombinantes (10-250kDa), 8 de ellas teñidas en azul y 2 en rosa (25 y 75 kDa). Se utilizó como buffer de electroforesis Tris, Glycine, SDS Buffer 10X (Bio-Rad) diluido a 1X en 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se corrió la electroforesis a 90 V durante aproximadamente 90-120 min. Tras la electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ NC) para proteínas medianas y pequeñas y a membranas de PVDF (Immobilon-P PVDF Membrane, Millipore, Merck) para proteínas grandes. Estas últimas deben ser activadas previamente. Se sumergen durante 1 min en metanol (Methanol,

HPLC for Gradient >Analysis, Fisher Chemical), equilibradas durante 2 min en H<sub>2</sub>O milliQ y en buffer de transferencia (100 ml de transfer buffer 10X (Tris/Glycine Buffer 10X (Bio-Rad)), 800 ml de H<sub>2</sub>O milliQ y 200 ml de metanol). En los cassettes de *Western-blot*, se colocaron del polo negativo al polo positivo: esponja, 3 papeles *Whatman* (GE Healthcare, Life Technologies), el gel de acrilamida, la membrana de PVDF o nitrocelulosa, 3 papeles *Whatman* y esponja. La transferencia se corrió durante 120-180 min a 200 mA y 4°C o a 30 V a 4°C durante toda la noche para proteínas de alto peso molecular.

#### 5.4. Bloqueo, incubación con anticuerpos primarios y secundarios, y revelado

Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de BSA (Albumin (BSA) Fraction V (pH 7.0) (Panreac AppliChem)) en TBS-T (1X TBS, 0.01% Tween® 20 (Bio-Rad)) durante 1 h, para eliminar uniones inespecíficas. El 1X TBS se preparó a partir de 20X TBS (60 g Tris Ultrapure (Panreac AppliChem), 60 g NaCl (Panreac AppliChem), 4 g KCl (Panreac AppliChem)) para 1 L pH 8). Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C durante toda la noche en agitación (Tabla 7).

**Tabla 7: Anticuerpos utilizados**

Anticuerpo	Proveedor	Especie	Dilución	
			WB	IF
α-tubulina (DM1A)	Sigma-Aldrich®	Monoclonal ratón	1:1 000	
β-actina (A2103)	Sigma-Aldrich®	Policlonal conejo	1:1 000	
p-H2A.X (Ser139) (9718)	Cell Signalling	Monoclonal ratón	1:750	1:100
Caspasa-clivada-3 (9662)	Cell Signalling	Policlonal conejo	1:500	
PARP-1clivada (51-66396R)	BD Biosciences	Monoclonal ratón	1:750	
p21 [EPR362] ab109520	Abcam	Monoclonal conejo	1:1 000	

**WB:** *Western-blot*; **IF:** Inmunofluorescencia

Seguidamente, las membranas fueron lavadas con TBS-T dos veces durante 15 min más un lavado de 10 min. Tras esto, fueron incubadas con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Si el anticuerpo primario fue de conejo, se usó el Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y si el anticuerpo primario fue de ratón, se usó Rabbit Anti-Mouse Peroxidase IgG (a9004) (Sigma-Aldrich®), ambos a dilución 1:10000.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se volvieron a realizar tres lavados con TBS-T (dos de 15 min y uno de 10 min), haciéndose un lavado final de 5 min con TBS 1X. Las membranas fueron reveladas en el equipo ChemiDoc Imaging System (Bio-

Rad) y para el revelado se utilizó el reactivo Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Life Sciences) o, en su defecto, si la señal obtenida fue débil, se usó Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad).

### **5.5. Cuantificación de bandas de *Western-blot***

Para cuantificar las bandas de proteínas se usó el programa Image Lab de Bio-Rad. Se seleccionó cada banda de forma individual, se restó el fondo inespecífico a cada una y se normalizó con respecto al valor de la banda de la proteína  $\alpha$ -tubulina o  $\beta$ -actina de la misma membrana, siendo uno de estos el control de carga.

## **6. Inmunofluorescencia**

Para las inmunofluorescencias se sembraron las células en placas de 10 mm<sup>3</sup>, donde se habían introducido previamente cubreobjetos circulares estériles de 1 cm por pocillo. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS y se pasó cada cristal a un pocillo de placa de 24 pocillos, donde se llevó a cabo el resto del protocolo. Se fijaron las células con una solución de paraformaldehído en H<sub>2</sub>O al 3% durante 30 min a temperatura ambiente. Después se lavaron las células con una solución de glicina 200 mM durante 15 min a temperatura ambiente y seguidamente se permeabilizaron las células con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®) al 0,5% durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se bloquearon con una solución de PBS 2X al 1% de BSA durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a una dilución apropiada durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se hicieron 4 lavados con PBS 1X 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en agitación y en oscuridad. Posteriormente, tras lavar de nuevo 4 veces con PBS 1X, se tiñeron los núcleos con DAPI (ThermoFisher Scientific, Life Technologies) diluido en PBS (dilución 1:1000) durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, tras lavar de nuevo con PBS 4 veces y una última vez con agua destilada, se montaron los cristales en los portaobjetos con solución *ProLong Gold* (Life Technologies). Los portaobjetos se guardaron a 4°C hasta su análisis. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS y se analizaron con el software LCS Lite y Fiji Software (173).

## 7. Citometría de flujo

### 7.1. Ensayo de actividad de MRP-1 con el sustrato fluorescente CFDA

Para medir la actividad de la bomba de eflujo MRP-1, se usó el compuesto fluorescente 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) (Sigma-Aldrich®) como sustrato típico de MRP-1. Se sembraron, en placa de 6 pocillos,  $150 \times 10^3$  células de SK-UT-1 y CP0024 o  $200 \times 10^3$  células de SW872, SW982 e ICP060 por pocillo en 2 ml de medio de cultivo completo.

Tras 24 horas y con una confluencia del 60-70%, se eliminó el medio y se incubaron las células con  $0,5 \mu\text{M}$  de CFDA en sus respectivos medios sin FBS durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en oscuridad. Se eliminó el medio con CFDA y se lavaron las células al menos tres veces con PBS estéril 1X a  $37^\circ\text{C}$ . Seguidamente, las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO), con probenecid  $200 \mu\text{M}$  y MK-571  $1 \mu\text{M}$  (controles positivos de inhibición de MRP-1) o con los diferentes inhibidores y TKIs (nilotinib, ripretinib, selumetinib y avapritinib tanto a 10 como  $5 \mu\text{M}$ ).

Tras 90 min de incubación con las drogas, se preparó nuevo CFDA a  $0,5 \mu\text{M}$  en medio sin suero y se incubó uno de los pocillos que sirvió como control positivo del experimento durante 30 min. Tras 2 h con los inhibidores o 30 min con CFDA para el grupo control, las células fueron lavadas dos veces con PBS estéril 1X a  $37^\circ\text{C}$  y tripsinizadas con  $300 \mu\text{l}$  de 0,05% Tripsina-EDTA, rojo fenol (Gibco™). Se paró la reacción añadiendo 1 ml de medio completo y la suspensión de células se pasó a tubos de citometría.

Los tubos fueron centrifugados a 1600 rpm (515 g) durante 5 min a temperatura ambiente en la centrifuga 5810R (Eppendorf, Fisher Scientific) y el sobrenadante fue descartado. Se resuspendió el botón celular en  $300 \mu\text{l}$  de PBS 1X y se analizó inmediatamente la fluorescencia intracelular de CFDA por citometría de flujo (detectado con excitación a 488 nm y emisión a 530 nm) en el citómetro analizador Canto II (Becton Dickinson, Nueva Jersey, USA). El análisis de los resultados se realizó con el software BD FACSDiva™ (Becton Dickinson).

### 7.2. Ensayo de actividad de P-gp con el sustrato fluorescente Rodamina 123

Para medir la actividad de la bomba de eflujo P-gp, se usó el compuesto fluorescente rodamina 123 (del inglés, *Rhodamine 123* (Rho-123) (Sigma-Aldrich®)) como sustrato típico de P-gp. Se sembraron, en placa de 6 pocillos,  $150 \times 10^3$  células de SK-UT-1 y CP0024 o  $200 \times 10^3$  células de SW872, SW982 e ICP060 por pocillo en 2 ml de medio de cultivo completo.

Tras 24 h y con una confluencia del 60-70%, se eliminó el medio y se incubaron las células con 0,5  $\mu\text{M}$  de Rho-123 en sus respectivos medios completos durante 30 min a 37°C en oscuridad. Se eliminó el medio con Rho-123 y se lavaron las células con PBS estéril 1X a 37°C. Seguidamente, las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO) o con los diferentes inhibidores y TKIs (nilotinib, ripretinib, selumetinib y avapritinib tanto a 10 como 5  $\mu\text{M}$ ).

Tras 90 min de incubación con las drogas, se preparó nueva Rho-123 a 0,5  $\mu\text{M}$  en medio completo y se incubó durante 30 min uno de los pocillos que sirvió como control positivo del experimento. Tras 2 h con los inhibidores o 30 min con Rho-123 para el grupo control, las células fueron lavadas con PBS estéril 1X a 37°C y tripsinizadas con 300  $\mu\text{l}$  de 0,05% Tripsina-EDTA, rojo fenol (Gibco™). Se paró la reacción añadiendo 1 ml de medio completo y la suspensión de células se pasó a tubos de citometría.

Los tubos fueron centrifugados a 1600 rpm (515 g) durante 5 min a temperatura ambiente en la centrifuga 5810R (Eppendorf, Fisher Scientific) y el sobrenadante fue descartado. Se resuspendió el botón celular en 300  $\mu\text{l}$  de PBS 1X y se analizó inmediatamente la fluorescencia intracelular de rodamina 123 por citometría de flujo (detectado con excitación a 488 nm y emisión a 530 nm) en el citómetro analizador Canto II (Becton Dickinson). El análisis de los resultados se realizó con el software BD FACSDiva™ (Becton Dickinson).

### **7.3. Ensayo de acumulación de doxorrubicina intracelular**

Con este ensayo, se midieron los niveles de doxorrubicina intracelular por citometría de flujo. Se sembraron 35 x 10<sup>3</sup> células en placas de 24 pocillos por duplicado para cada condición experimental. Cuando las células presentaron una confluencia del 60-70% en fase de crecimiento exponencial (24 h aproximadamente) fueron tratadas con los inhibidores correspondientes (nilotinib, ripretinib, selumetinib, avapritinib) a 5 y 10  $\mu\text{M}$ , el vehículo (DMSO) o con medio (control). 24 h después se añadió, a las diferentes condiciones, a excepción del control, doxorrubicina a 500 nM – 1  $\mu\text{M}$ . Al finalizar las 48 h de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas con 0,05% Tripsina-EDTA, rojo fenol (Gibco™) y tras añadir medio completo, se recogieron en tubos de citometría. Se centrifugaron los tubos a 1600 rpm (515 g) durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los botones celulares en 300  $\mu\text{l}$  de PBS 1X y se analizaron los niveles de doxorrubicina intracelular en el citómetro analizador Canto II (Becton Dickinson). La doxorrubicina presenta una excitación a 488 nm y emisión a 580nm. El análisis de los resultados se realizó con el software BD FACSDiva™ (Becton Dickinson).

#### **7.4. Ensayo Anexina V – Yoduro de propidio**

Para detectar apoptosis celular tras los tratamientos con las diferentes drogas e inhibidores, se usó el kit de detección de apoptosis Anexina V – FITC (Immunostep, Salamanca, España). El marcaje simultáneo con Anexina V FITC y yoduro de propidio (IP) permite la discriminación de células intactas (Anexina-FITC negativo, IP negativo), células en apoptosis temprana (Anexina-FITC positivo, IP negativo) y células en apoptosis tardía (Anexina-FITC positivo, IP positivo) y células necróticas (Anexina-FITC negativo, IP positivo).

Se preparó un control negativo no tratando las células, que se utilizó para definir el nivel basal de células apoptóticas, necróticas o muertas. Tras el tratamiento correspondiente, se recogieron las células y se lavaron con PBS estéril 1X. En este punto, se tomaron 50-100 µl de células de todas las condiciones para tener un control positivo que se marcó solamente con Anexina-FITC y otro con IP solamente, para comprobar que los marcajes se han realizado de manera correcta. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm (211 g).

Se preparó tampón de unión con Anexina V y tras aspirar el sobrenadante de los pellets celulares, se añadió 200 µl a cada tubo y se resuspendieron las células. Se incubaron 10-15 min en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 ml de tampón de unión a cada tubo y se centrifugó nuevamente 5 min a 1500 rpm. Se preparó una nueva solución de tampón de unión esta vez con IP y tras aspirar el sobrenadante, se resuspendieron en 100 µl de dicho tampón. Se incubaron las células 5 min en oscuridad y se pasaron directamente por el citómetro analizador Canto II (Becton Dickinson). El análisis de los resultados se realizó con el software BD FACSDiva™ (Becton Dickinson).

#### **7.5. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo**

Tras el tratamiento con los fármacos correspondientes, las células se tripsinizaron con 0,05% Tripsina-EDTA, rojo fenol (Gibco™). Se centrifugaron las células 5 min a 1500 rpm (211 g), para lavarlas seguidamente con PBS 1X y centrifugar de nuevo. Se añadieron 500 µl de etanol al 70% (diluido en PBS 1X) y se incubaron 30 min a 4°C. Tras la incubación, se centrifugaron los tubos a 1800 rpm (304 g) durante 10 min. Se preparó una mezcla de IP (Sigma-Aldrich®) a concentración 1mg/ml y RNaseA (Qiagen®) a concentración 50 mg/ml en 500 µl de PBS que se añadió a los botones celulares tras aspirar el sobrenadante. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación horizontal y en oscuridad. Se midió en el citómetro analizador Canto II (Becton Dickinson). Los datos fueron analizados con el software FlowJo\_V10 (Ashland, Oregon).



## 8. Ensayos *in vivo*

Todos los ratones se mantuvieron de acuerdo con las normas establecidas en el animalario del IBiS (basadas en lo estipulado en el Real Decreto 53/2013) y se sacrificaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub> cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, con el fin de evitar el sufrimiento del animal. El comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío/Virgen Macarena aprobó los procedimientos (Código 16/05/2017/061).

### 8.1. Generación de modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX).

Para generar cada uno de los modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX), se partió de una muestra tumoral (biopsia escisional o tru-cut) de pacientes con LMS/LPS, previa obtención del consentimiento informado para la utilización de la muestra por el Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

La muestra fue implantada en un ratón atímico de la especie Nude-Foxn1 (Charles River Laboratories) hasta alcanzar un crecimiento adecuado, tras el que se sacrificó al ratón y se pasó a sucesivos ratones hasta establecer el modelo, guardando muestras del ratón para su posterior caracterización y reimplantes.

Para los experimentos, se utilizaron hembras de 6-8 semanas de ratones atímicos de la especie Nude-Foxn1 (Charles River Laboratories). Los ratones fueron anestesiados con 100 µl de una mezcla de los anestésicos diazepam (Roche) y ketamina (Pfizer) en una proporción 1:3 administrados por inyección intraperitoneal. Subcutáneamente, en el flanco derecho de la pata derecha del ratón, se implantaron las muestras tumorales de un volumen aproximado de 10 mm<sup>3</sup>. Se colocaron en una placa térmica a 37°C durante 1 h hasta que se recuperaron del procedimiento. Tras ello, se esperó unas 3-7 semanas hasta que los tumores alcanzaron un volumen mínimo de 150 mm<sup>3</sup> para comenzar el tratamiento correspondiente.

### 8.2. Tratamientos de los modelos xenoinjertados

Los ratones fueron randomizados según su tamaño tumoral a los siguientes 4 grupos de tratamiento:

- Grupo control, recibiendo suero fisiológico intraperitoneal con aguja insulina U-100 (0,3 mm (29 G) x 12,7 mm) (BD Microfine; Beckton Dickinson and Company, USA).
- Grupo eribulina en monoterapia, recibiendo dosis de 1,6 mg/kg intravenosa por cualquiera de las dos venas laterales de la cola con jeringas con aguja interior estéril (0,40 mm (27G) x 10 mm) (BD Microfine).

- Grupo gemcitabina en monoterapia, recibiendo dosis de 120 mg/kg intraperitoneal con aguja insulina U-100 (0,3 mm (29 G) x 12,7 mm) (BD Microfine).
- Grupo de combinación de eribulina y gemcitabina, recibiendo dosis de 1,6 mg/kg de eribulina intravenosa por las venas laterales de la cola y 120mg/kg de Gemcitabina intraperitoneal con las agujas anteriormente referenciadas.

Para el tratamiento intravenoso por cola, los ratones fueron inmovilizados en un retenedor para ratones de 35g (90x30mm, ref.: LE5016; Letica Scientific Instruments)

Los ratones fueron tratados con un solo ciclo de tratamiento que consistió en dos dosis, una en día 0 y otra en el día 7 de cada ciclo de 21 días de tratamiento. Los tumores fueron medidos y los ratones pesados 3 veces por semana. Tras 21 días, los ratones fueron sacrificados, si previamente no habían llegado al volumen máximo tumoral (1500 mm<sup>3</sup>). En una segunda aproximación experimental, tras el ciclo de tratamiento, se mantuvieron los ratones hasta que alcanzaron el volumen tumoral máximo. Los ratones se sacrificaron en cámara de CO<sub>2</sub>, de acuerdo con las normas éticas del tratamiento animal.

### **8.3. Necropsias**

Una vez sacrificados los animales, se realizó la necropsia completa (a excepción del cerebro) y se recogieron muestras tanto del tumor como de hígado, pulmón, bazo y riñones para realizar el correspondiente análisis histológico y molecular. Las muestras tumorales se dividieron en 2 partes, una para histología incluida en casete (Endo plasticware), y otra para análisis de ARN/ADN. Las muestras para histología se fijaron en formol (Thermo Fisher Scientific) al 4% durante 24 h. Por otro lado, los trozos de tumor destinados para análisis de ARN/ADN se congelaron de inmediato en criotubos en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

### **9. Técnicas inmunohistoquímicas sobre las muestras de PDX**

Tras 24 h de fijación en formol (Epredia™ Formal-Fixx™, Thermo Fisher Scientific) y una vez depositadas las muestras en la retorta de la del procesador automático de tejidos LEICA ASP300, se seleccionó el siguiente programa con los sucesivos pasos: dos pasos de formol 30 min, dos pasos de etanol 70% 30 min, dos pasos de etanol 96% 45 min, dos pasos de etanol 100% 40 min, dos pasos de xilol 30 min y 3 pasos de parafina 1 h. Una vez las muestras salen del procesador, se procedió a elaborar los bloques de parafina en el Histocore Arcadia H, de Leica. Este protocolo fue llevado a cabo por el servicio de histología del IBiS.

La tinción de CD31 en las muestras tumorales fue realizada por el Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Se cortaron secciones de tejido de 5 micras de los bloques de parafina, se calentaron 20 min a 65°C y la inmunohistoquímica se realizó de manera automática usando el equipo BOND RXm instrument (Leica Biosystems). Tanto el anticuerpo primario (CD31, (PECAM-1) (D8V9E) XP®, Cell Signalling, a una dilución 1/90) como el secundario conjugado a HRP (Visualization reagent, Agilent) fueron aplicados durante 1 h respectivamente. Los cortes se montaron en DPX (BDH Laboratories, Poole, UK). La recuperación del antígeno se realizó con solución EDTA (pH 8,0).

Para las tinciones hematoxilina-eosina se realizaron secciones de 4 micras en portaobjetos, que se desparafinaron en xilol, se rehidrataron en una serie de alcoholes crecientes y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Agilent Dako). Posteriormente, se deshidrataron en alcoholes crecientes, xilol y finalmente se montaron en DPX. Todo el proceso se realizó de forma automatizada utilizando el instrumento CoverStainer (Dako Agilent). Los portaobjetos teñidos se visualizaron mediante un microscopio óptico.

El análisis de la densidad de microvasos fue llevada a cabo por un patólogo. Se analizaron hasta 5 campos diferentes por muestra (20x/22 (0,95 mm<sup>2</sup>/campo), buscando las zonas consideradas como “hot-spots”, zonas con alta densidad vascular en el tumor y evitando las zonas de necrosis tumoral. Dentro de estos campos se contabilizaron todos los vasos (maduros e inmaduros) positivos para CD31. La densidad de microvasos se expresó como nº de vasos por HPF.

#### **10. Datos demográficos e histopatológicos de los pacientes reclutados en el ensayo fase III ISG-STS 1001.**

Las muestras usadas en el estudio traslacional fueron coleccionadas prospectivamente en el ensayo ISG-STS 1001 (número de ensayo clínico NCT01710176, y número EUDRACT 2010-023484-17) (31). En este ensayo, los pacientes fueron asignados aleatoriamente para recibir tres ciclos de quimioterapia neoadyuvante estándar (epirrubicina 60mg/m<sup>2</sup>/día en los días 1 y 2 del ciclo más ifosfamida 3g/m<sup>2</sup>/día, en los días 1, 2 y 3) programados cada 3 semanas (brazo estándar) o tres ciclos de quimioterapia neoadyuvante adaptada a la histología (brazo experimental) que consistió en:

- trabectedina (1,3mg/m<sup>2</sup>/día) cada 3 semanas para LPS mixoide de alto grado;
- gemcitabina (1800mg/m<sup>2</sup>/día) más dacarbazina (500mg/m<sup>2</sup>/día) cada 14 días para LMS;

- altas dosis de ifosfamida ( $14\text{g}/\text{m}^2$ ) en infusión continua mediante bomba portátil cada 28 días para sarcoma sinovial;
- etopósido ( $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ) más ifosfamida ( $3\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ ), ambos del día 1 al 3 del ciclo cada 21 días para MPNST (tumor de vaina nerviosa periférico, del inglés *malignant peripheral nerve sheath tumor*)
- gemcitabina ( $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ) los días 1 y 8 más docetaxel ( $75\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ) el día 8 para UPS.

Los pacientes diagnosticados con mixofibrosarcoma, LPS pleomórfico, rhabdomiosarcoma pleomórfico y sarcoma de células fusiformes no clasificables no fueron aleatorizados, sino que fueron registrados y tratados con la QT estándar (denominado brazo de registro). Del mismo modo, los casos que se podían asignar a los brazos de gemcitabina o trabectedina, y para los que se consideraba necesaria la RT preoperatoria, se asignaron solo para el registro con QT estándar. A los pacientes se les realizó seguimiento cada 3 meses durante los 3 primeros años con imágenes de tórax y cada 6 meses el cuarto y quinto año y a partir de entonces anualmente. Se recomendó imagen por resonancia magnética (RMN) durante los 5 primeros años cada 6 meses, pasando a control anual a partir del quinto año. Eran obligatorios tanto la revisión patológica central como la radiológica. Los pacientes reclutados en el ensayo consintieron participar en el estudio traslacional aquí presentado, firmando un formulario de consentimiento informado. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por el Comité de Ética de los hospitales, así como en conformidad con la Declaración de Helsinki.

#### **11. Construcción de los microarrays tisulares (TMA) e inmunohistoquímicas relacionadas.**

La valoración de MRP-1 fue realizada en todos los casos que entraron en el estudio para los cuales había material adecuado disponible. Las áreas tumorales elegidas para los microarrays tisulares (TMAs) fueron seleccionadas por patólogos sin acceso a los resultados del estudio clínico. La construcción del TMA se realizó utilizando un *arrayer* de tejidos automatizado (Minicore Excilone; Elancourt, Francia). Las muestras para los TMAs fueron de 1,0 mm de diámetro y se obtuvieron de los bloques de parafina de tumor de cada paciente incluido post-tratamiento. Posteriormente, se cortaron secciones de 4  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina o con el anticuerpo monoclonal contra MRP-1: QCRL-1 (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Tanto la expresión como la intensidad de MRP-1 por inmunohistoquímica fue en primer lugar evaluada por los patólogos clasificándolas en varios niveles para posteriormente agruparla para la realización de los análisis. La expresión MRP-1 fue agrupada como baja ( $\leq 25\%$  de

células positivas) y como la alta extensión (>25% de células positivas), mientras que la intensidad de la inmunohistoquímica fue clasificada en 5 subtipos que posteriormente fueron agrupados como intensidad negativa/débil (0, + o ++) o intensidad fuerte (+++ o ++++). El tejido de riñón fue utilizado como control positivo de la inmunohistoquímica, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dos patólogos con gran experiencia en sarcomas fueron los responsables de revisar la expresión de proteína MRP-1, cegados a los datos clínicos. Cada patólogo revisó independientemente todos los núcleos de TMA.

## 12. Análisis estadísticos basados en los resultados de los TMAs

Los datos clínicos y demográficos se expresaron en términos de frecuencia y porcentaje para las variables categóricas, y para las cuantitativas como mediana y rango intercuartílico. La mediana de seguimiento fue evaluada usando el método "Kaplan-Meier reverso" para SG (174). La SG fue medida desde la entrada del paciente en el ensayo hasta su muerte. La supervivencia de los pacientes que no experimentaron el evento considerado durante el seguimiento fue censurada en el momento del último seguimiento. La SLP se calculó desde la entrada del paciente al ensayo hasta la progresión o la muerte, según lo que sucedió en primer lugar. Para la SLP, los pacientes que no experimentaron progresión o muerte, durante el período de seguimiento, fueron censurados en el momento del último seguimiento. Las funciones de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante la prueba de rango logarítmico (*log rank test*). El análisis explorativo de subgrupos basado en histotipo fue realizado estimando la regresión de Cox (*Cox's regression hazard ratio*) y los intervalos de confianza asociados, y representando dichos datos en un diagrama de tipo bosque (*forest-plot*). Se realizó un análisis pronóstico de la SG y la SLP analizando los posibles factores clínicos sugeridos por el análisis de regresión de Cox. El coeficiente kappa de Cohen ( $\kappa$ ) se calculó para evaluar la concordancia entre los análisis de ambos patólogos. A menos que se especifique lo contrario, los intervalos de confianza fueron de dos colas y calculados considerando un nivel de confianza de 0,95. Las pruebas realizadas se consideraron estadísticamente significativas donde los valores de p fueron <0,05. El análisis estadístico se realizó utilizando R 3.5.2 R Core Team (2020).

## 13. Estudio *in-silico* de *docking* molecular

Para estudiar la afinidad de cada uno de los inhibidores con las bombas de eflujo P-gp, MRP-1 y BCRP, se realizó una predicción *in silico* de la energía de afinidad de las moléculas nilotinib, avapritinib (BLU-285), ripretinib, MK-571, selumetinib y probenecid sobre las 3 proteínas. El estudio *in-silico* fue realizado por el grupo de Medicina computacional de sistemas liderado por el Dr. Joaquín Dopazo Blázquez.

### 13.1. **Docking molecular proteína-ligando**

Las 3 proteínas de la familia ABC estudiadas tienen una estructura similar: se componen de un dominio ATPasa intracelular muy conservado a nivel de secuencia, y un dominio transmembrana, que es el encargado del reconocimiento y el transporte del sustrato (175, 176). Para BCRP y P-gp, existen numerosos cristales de alta resolución de la proteína completa, algunos de los cuales han sido co-cristalizados con otros inhibidores. En el caso de MRP-1, a pesar de que no existen cristales completos en humano, sí que existen estructuras cristalizadas de proteínas homólogas con alta identidad de secuencia, lo cual hace del modelado por homología una aproximación factible.

Con el objetivo de reducir posibles artefactos en el cálculo de la energía de afinidad, el análisis se realizó de forma redundante para cada caso utilizando proteínas cristalizadas en diferentes condiciones. Así pues, para BCRP, se utilizaron las estructuras con identificador PDB (177) 5nj3, 6eti, 6feq, 6ffc, 6hij, 6vxh, 6vxi y 6vxj, y para P-gp, las estructuras 5och, 6c0v, 6fn1, 6fn4 y 6qex. Dado que actualmente no existen estructuras completas para MRP-1, en este caso se utilizaron estructuras modeladas por homología mediante *swiss-model* (178), utilizando las referencias 6pzc, 5ko2, 6uy0, 6bhu, 5koy, 4lsg, 6ujr, 3g5u, 5uja, 6bhu, 5uja, 5ko2, 5uj9, 6pzb, 6pzi, 6uy0, 5uj9, 5kpd, 3g5u, 5kpi, 5kpi, 4lsg y 5kpd. En todos los casos, se eliminaron los heteroátomos co-cristalizados y se utilizó *autodock tools* v1.5.7 (179) para preparar las estructuras y los ligandos.

Para realizar el *docking* se utilizó *Autodock Vina* v1.1.2 (180) con una exhaustividad de 500 (*exhaustiveness=500*). Con el objetivo de reducir el espacio de búsqueda, el análisis se restringió al canal transmembrana. En los casos en los que, adicionalmente, se realizó un *docking* flexible, se marcaron como residuos flexibles todos aquellos situados a menos de 5°A de la pose de menor energía del inhibidor en el modelo rígido correspondiente y se estableció una exhaustividad de 100.

### 13.2. **Estimación de la afinidad de unión proteína-ligando**

Con el objetivo de mejorar las predicciones obtenidas en el *docking* molecular, se utilizó KDeep (181), herramienta que utiliza redes neuronales convolucionales 3D para predecir la afinidad de unión de un complejo proteína-ligando previamente posicionado en la conformación de interacción (co-cristalizados o posicionados mediante *docking*) para predecir la afinidad de unión.

Para cada par proteína-ligando, se utilizó la estructura con menor energía de interacción calculada en el punto 13.1. Por un lado, la proteína sin el ligando se transformó al formato PDB utilizando *openbabel* (182). Por otro lado, se realizó una

corrección manual de la estructura del ligando y se realizó una minimización de energía mediante el programa Avogadro (183). Tanto la proteína como el ligando se hidrogenaron acorde a un pH de 7.4.

#### **14. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico de todos los experimentos fueron utilizados tanto el programa GraphPad Prism como el programa SPSS. Se utilizó la prueba estadística *T-student* para muestras no pareadas. Valores de  $p$  inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos y se representaron según la siguiente clasificación:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*), y  $p < 0,001$  (\*\*\*). Además, se utilizó la prueba Log-rank (Mantel-Cox) para el análisis de supervivencia en el experimento de PDX y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para la evaluación de la inhibición del crecimiento tumoral.





## Resultados



## Capítulo I: Estudio de la inhibición de MRP-1 en combinación con quimioterápicos como estrategia de para revertir la resistencia a fármacos en sarcomas de partes blandas.

### 1. Valor pronóstico/predictivo de MRP-1 en pacientes tratados con antraciclinas e ifosfamida

En primer lugar, quisimos estudiar el papel de MRP-1 en un contexto clínico de pacientes tratados con el régimen estándar de quimioterapia: antraciclinas más ifosfamida. Un total de 264 pacientes reclutados en el ensayo ISG-STS 1001 fueron incluidos en este estudio traslacional. De ellos, 175 fueron asignados aleatoriamente al brazo de tratamiento estándar (n=88) o al brazo experimental (n=87), mientras que 89 de ellos se registraron y se trataron con QT estándar (brazo registro). La edad media al diagnóstico fue 53 años, con una predominancia masculina de un 62% contra un 38% de mujeres. Los subtipos más frecuentes fueron sarcoma pleomórfico indiferenciado (UPS, 28%), LPS mixoide de alto grado (21%) y sarcoma sinovial (16%) (Tabla 8).

La expresión de MRP-1 fue alta en un 43% de las muestras tumorales de pacientes (112/264), baja en el 44% (119/264) y no evaluable en el 13% de los pacientes (33/264). La intensidad de la expresión de MRP-1 fue fuerte en el 31% de los casos (81/264), baja-negativa en el 56% de los tumores (150/264) y no evaluable en el 13% de los casos (33/264). En la tabla 8 se muestra toda la información detallada y en la figura 10 se muestran ejemplos de la inmunodetección de MRP-1 en las muestras tumorales. La alta expresión de MRP-1 fue observada en un 62% de los sarcomas sinoviales (26/42), en un 52% de los mixofibrosarcomas (17/33) y en un 46% de los UPS (34/74) y de forma similar, la alta intensidad se observó en un 45% de los sarcomas sinoviales (19/42), un 46% de los mixofibrosarcomas (15/33) y un 32% de los UPS (24/74). La información adicional sobre la expresión de MRP-1 se muestra en la tabla 9. El nivel de concordancia entre ambos patólogos fue excelente tanto para la evaluación de la expresión de MRP-1 ( $\kappa=0,83$  (95% CI, 0,71-0,95;  $p<0,001$ )) como para la evaluación de la intensidad ( $\kappa=0,90$  (95% CI, 0,86-0,95;  $p<0,001$ )).



**Figura 10: Expresión proteínica de MRP-1 en las muestras tumorales de los pacientes.** (A) Ejemplo de inmunotinción de MRP-1 negativa (B) Ejemplo de inmunotinción positiva de MRP-1. (C) Detalle de la tinción de MRP-1 (citoplásmica y de membrana) a 20X.

Tabla 8: Datos demográficos de los pacientes pertenecientes al ensayo ISG-ST5 1001.

	Todos los pacientes (n=264)	Pacientes con quimioterapia estándar (n=88)	Pacientes con quimioterapia - Registro (n=89)	Pacientes con quimioterapia basada en histología (n=87)
<b>Edad media (años)</b>	53	48	56	50
<b>Género</b>				
- Hombre	163 (62%)	53 (60%)	57 (64%)	53 (61%)
- Mujer	101 (38%)	35 (40%)	32 (36%)	34 (39%)
<b>Mediana de tamaño (cm)</b>	10.8	10.1	12.2	9.7
<b>Localización</b>				
- Miembros inferiores	179 (68%)	63 (72%)	58 (65%)	58 (67%)
- Pelvis	30 (11%)	8 (9%)	10 (11%)	12 (14%)
- Miembros superiores	24 (9%)	6 (7%)	12 (14%)	6 (7%)
- Cintura escapular	22 (8%)	8 (9%)	7 (8%)	7 (8%)
- Pared torácica	5 (2%)	1 (1%)	1 (1%)	3 (3%)
- Pared abdominal	2 (1%)	1 (1%)	0 (0%)	1 (1%)
- Paravertebral	2 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	0 (0%)
<b>Histología revisada</b>				
- UPS	74 (28%)	21 (24%)	20 (22%)	33 (38%)
- LPS mixoide cél. redondas*	55 (21%)	24 (27%)	13 (14%)	18 (21%)
- Sarcoma sinovial	42 (16%)	22 (25%)	0 (0%)	20 (23%)
- Mixofibrosarcoma	33 (12%)	0 (0%)	33 (37%)	0 (0%)
- LMS	25 (9%)	10 (12%)	6 (7%)	9 (10%)
- MPNST	16 (6%)	9 (10%)	0 (0%)	7 (8%)
- LPS pleomórfico	10 (4%)	1 (1%)	9 (10%)	0 (0%)
- Células fusiformes no clasif.	5 (2%)	1 (1%)	4 (5%)	0 (0%)
- RMS pleomórfico	4 (2%)	0 (0%)	4 (5%)	0 (0%)
<b>Expresión MRP-1**</b>				
- 0 - 4%	105 (40%)	38 (43%)	40 (45%)	27 (31%)
- 5 - 25%	14 (4%)	4 (5%)	5 (6%)	5 (5%)
- 26 - 49%	25 (10%)	9 (10%)	6 (7%)	10 (12%)
- 50 - 100%	87 (33%)	29 (33%)	25 (28%)	33 (38%)
- No evaluable	33 (13%)	8 (9%)	13 (14%)	12 (14%)
<b>Intensidad MRP-1**</b>				
- Nula	105 (40%)	38 (43%)	40 (45%)	27 (31%)
- Débil	36 (14%)	12 (14%)	9 (10%)	15 (17%)
- Levemente fuerte	9 (3%)	2 (2%)	3 (4%)	4 (5%)
- Moderado fuerte	15 (6%)	6 (7%)	3 (4%)	6 (7%)
- Fuerte	66 (25%)	22 (25%)	21 (23%)	23 (26%)
- No evaluable	33 (13%)	8 (9%)	13 (14%)	12 (14%)
<b>Mediana de seguimiento (años)</b>		4,45 (95CI: 4,09 – 4,75)		

\*Componente celular > 5%; \*\*Áreas de alto grado de las muestras tumorales; UPS: Sarcoma pleomórfico indiferenciado; LPS: Liposarcoma; LMS: Leiomiomasarcoma; MPNST: Tumor maligno de vaina nerviosa periférica; RMS: Rabiomasarcoma.

En el análisis univariante, la alta expresión de MRP-1 correlacionó significativamente con una peor SLP [HR 2,71 (95% CI, 1,31-5,62), p=0,007] en los pacientes asignados aleatoriamente al brazo estándar de quimioterapia. En cuanto a la SG, se observó una tendencia en el mismo grupo de pacientes [HR=2,75 (95% CI, 0,97-7,81)] p=0,058 (Figura 11A,C).

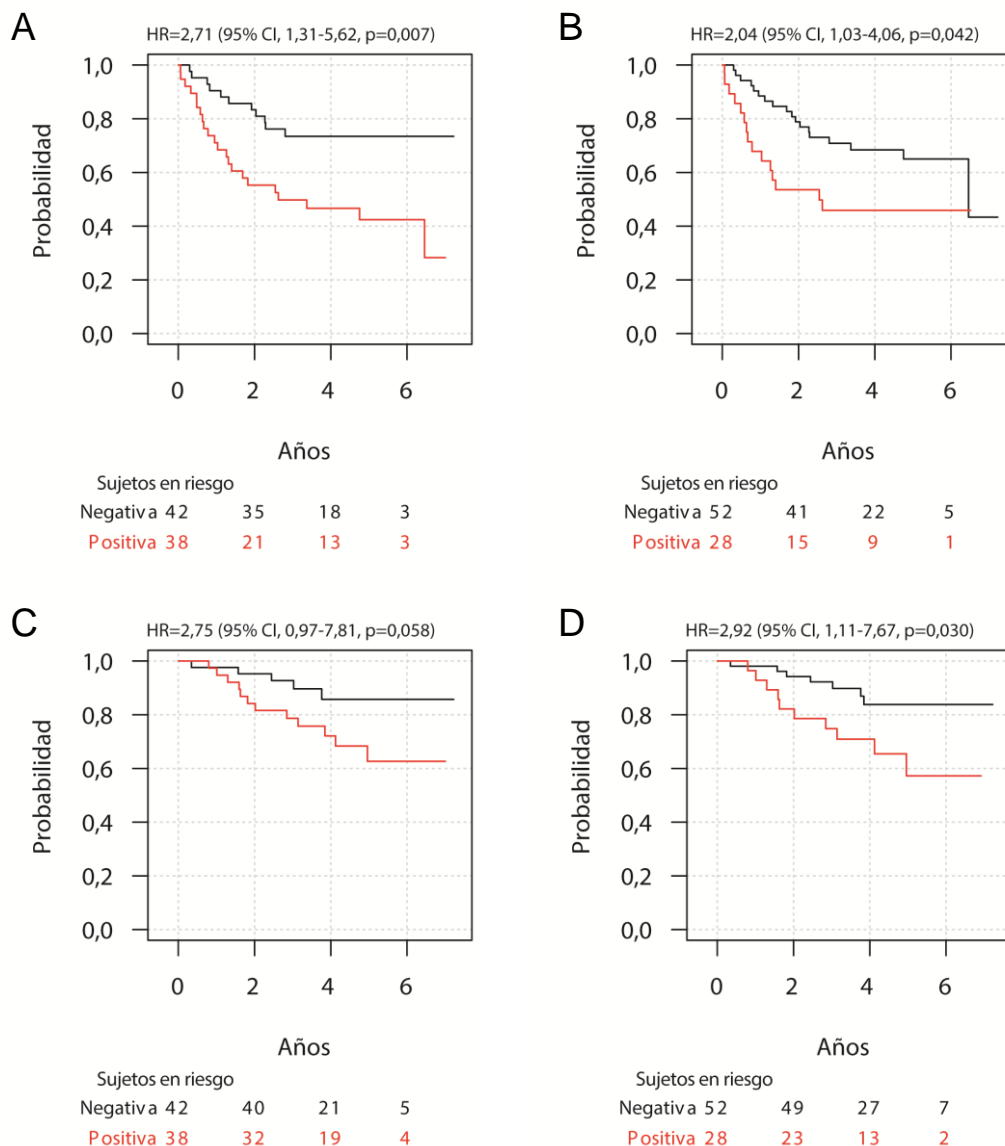
Tabla 9: Distribución de la expresión de MRP-1 por subtipo histológico.

		Expresión MRP-1			Intensidad MRP-1		
		Baja	Alta	NE	Negativa/débil	Positiva	NE
UPS (N=74)	Randomizado (n=54)	20 (37%)	27 (50%)	7 (13%)	26 (48%)	21 (39%)	7 (13%)
	Registro (n=20)	11 (55%)	7 (35%)	2 (10%)	15 (75%)	3 (15%)	2 (10%)
RC MLPS (n=55)	Randomizado (n=42)	25 (60%)	12 (28%)	5 (12%)	30 (71%)	7 (17%)	5 (12%)
	Registro (n=13)	9 (69%)	1 (8%)	3 (23%)	8 (62%)	2 (15%)	3 (23%)
SS (n=42)	Randomizado (n=42)	11 (26%)	26 (62%)	5 (12%)	18 (43%)	19 (45%)	5 (12%)
	Registro (n=0)	-	-	-	-	-	-
LMS (n=25)	Randomizado (n=19)	9 (47%)	8 (42%)	2 (11%)	11 (58%)	6 (31%)	2 (11%)
	Registro (n=6)	5 (83%)	1 (17%)	0	5 (83%)	1 (17%)	0
MPNST (n=16)	Randomizado (n=16)	8 (50%)	7 (44%)	1 (6%)	11 (69%)	4 (25%)	1 (6%)
	Registro (n=0)	-	-	-	-	-	-
MFS (n=33)	Randomizado (n=0)	-	-	-	-	-	-
	Registro (n=33)	11 (33%)	17 (52%)	5 (15%)	13 (39%)	15 (46%)	5 (15%)
Otros* (n=19)	Randomizado (n=2)	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (100%)	0	0
	Registro (n=17)	9 (53%)	5 (29%)	3 (18%)	11 (64%)	3 (18%)	3 (18%)
Total (n=264)	Randomizado (n=175)	74 (42%)	81 (46%)	20 (12%)	98 (56%)	57 (32%)	20 (12%)
	Registro (n=89)	45 (50%)	31 (35%)	13 (15%)	52 (59%)	24 (26%)	13 (15%)

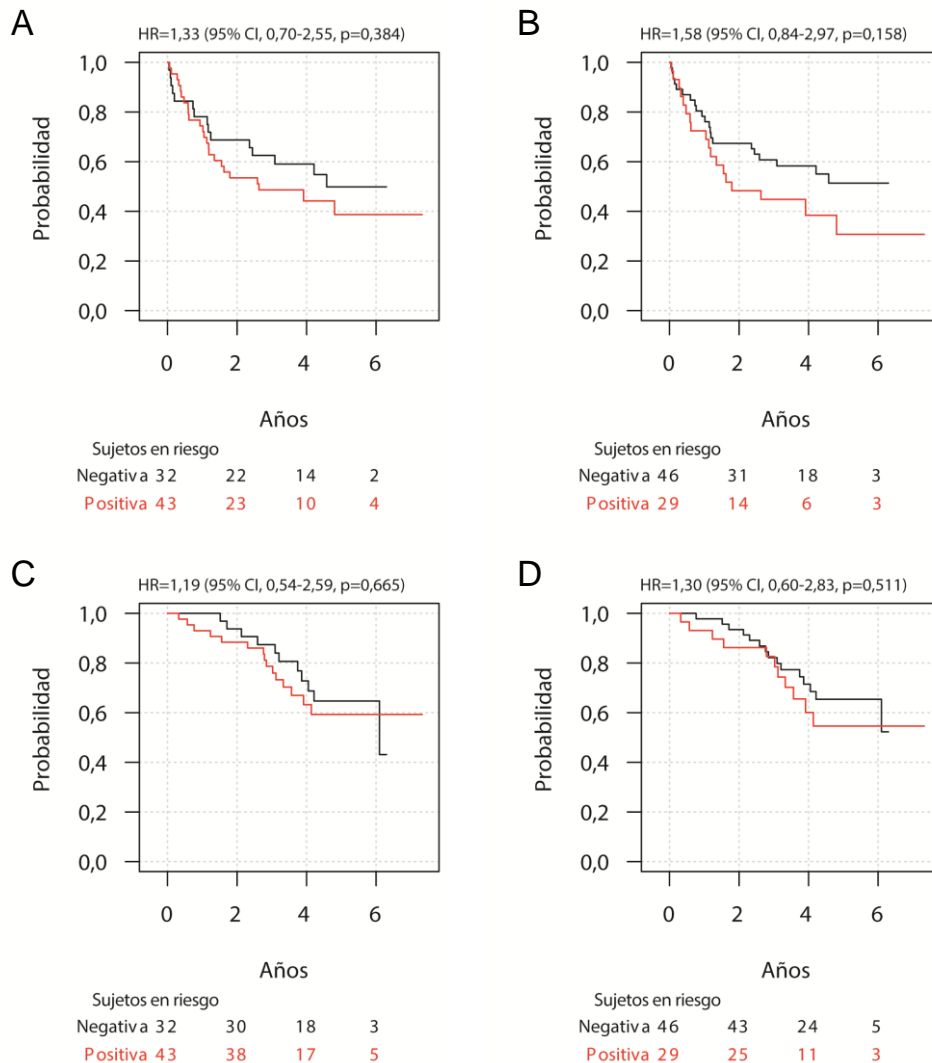
\* Incluye sarcoma de células fusiformes no clasificable, liposarcoma y rhabdomyosarcoma pleomórficos; Baja: ( $\leq 25\%$  células positivas) y Alta ( $>25\%$  células positivas). El grupo randomizado se compone de los grupos de tratamiento estándar y tratamiento adaptado a la histología; Registro: tratamiento estándar. LMS:

Leiomiosarcoma; MFS: Mixofibrosarcoma; MPNST: Tumor de vaina nerviosa periférico; RC MLPS: Liposarcoma mixoide de células redondas; SS: Sarcoma sinovial; UPS: Sarcoma pleomórfico indiferenciado. NE: No evaluable.

Del mismo modo, la intensidad de MRP-1 se relacionó de manera significativa tanto con la SLP [HR=2,04 (95% CI, 1,03-4,06)],  $p=0,042$  como con la SG [HR=2,92 (95% CI, 1,11-7,67)],  $p=0,030$  en el mismo subgrupo de pacientes asignados aleatoriamente al régimen estándar de dosis completas de antraciclinas más ifosfamida (Figura 11B,D).

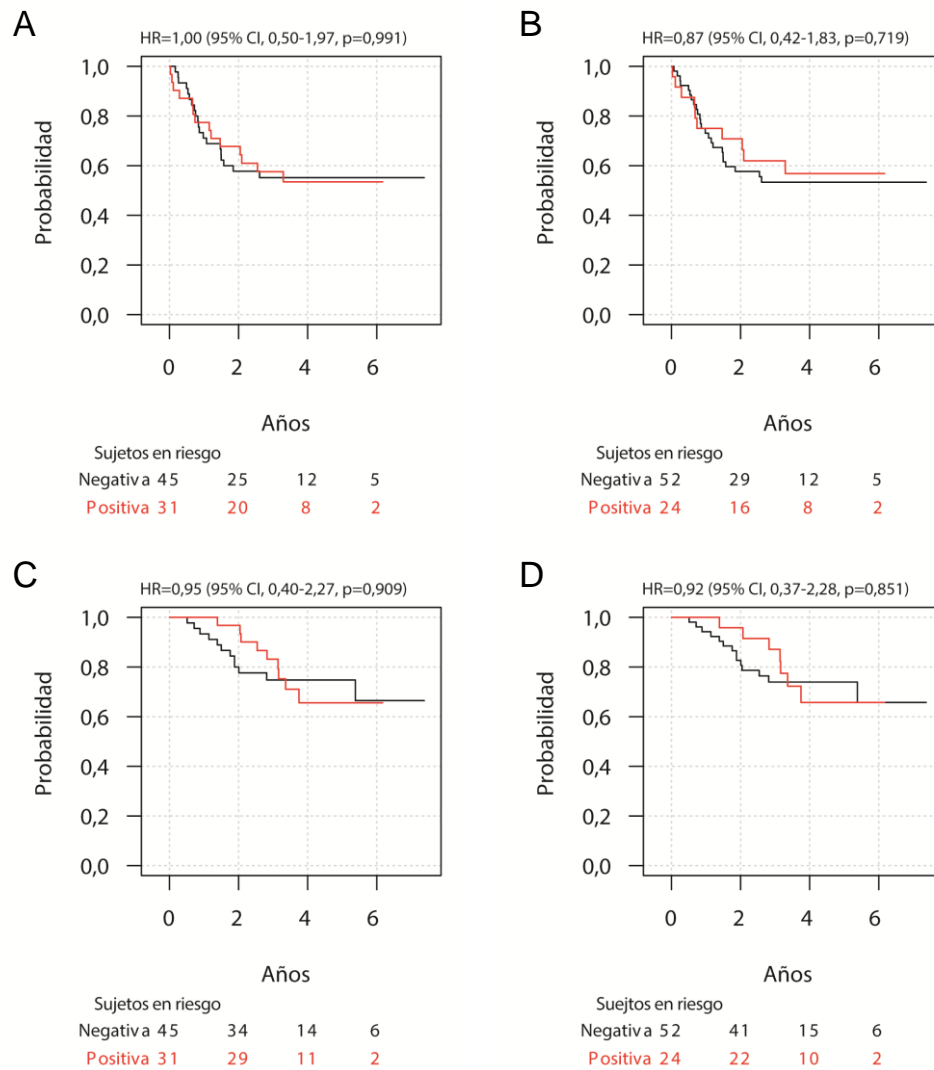


**Figura 11: Análisis de supervivencia en el brazo estándar de tratamiento.** (A) SLP de acuerdo con la expresión de MRP-1, estando la expresión agrupada como baja ( $\leq 25\%$  células positivas) vs. alta ( $> 25\%$  células positivas). (B) SLP de acuerdo con la intensidad de inmunotinción de MRP-1, agrupada como intensidad negativa/débil (0, + o ++ ) o intensidad alta (+++ o ++++). (C) SG de acuerdo con la expresión de MRP-1, estando la expresión agrupada como baja ( $\leq 25\%$  células positivas) vs. alta ( $> 25\%$  células positivas). (D) SG de acuerdo con la intensidad de inmunotinción de MRP-1, agrupada como intensidad negativa/débil (0, + o ++ ) o intensidad alta (+++ o ++++).



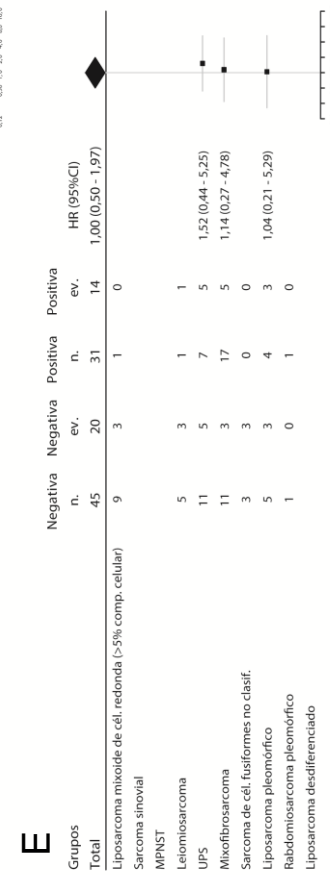
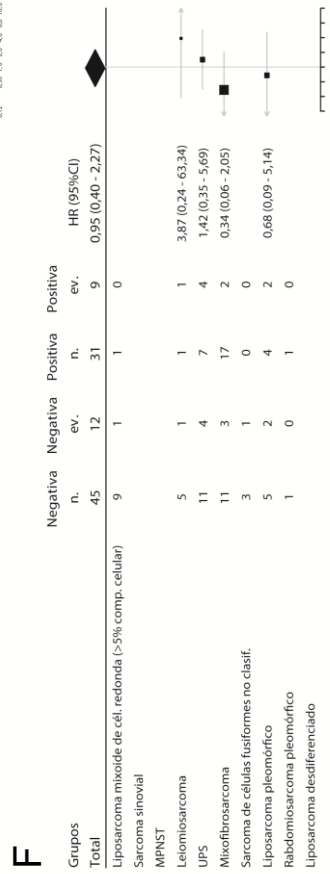
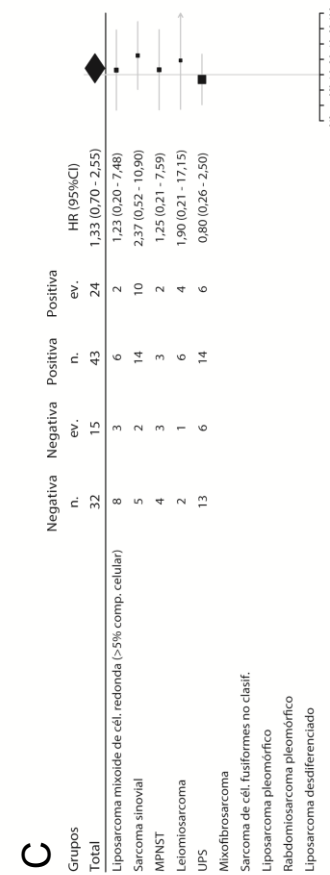
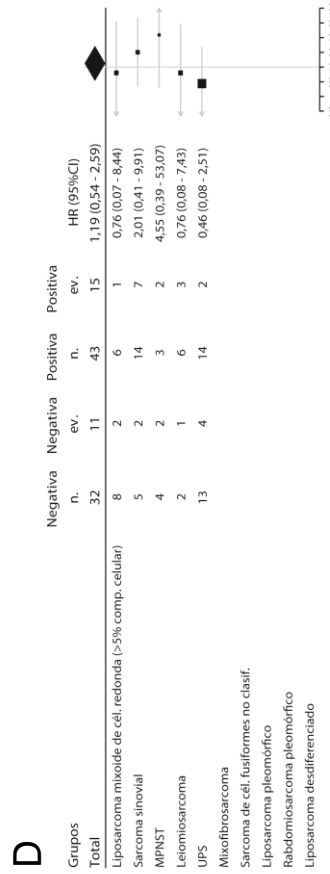
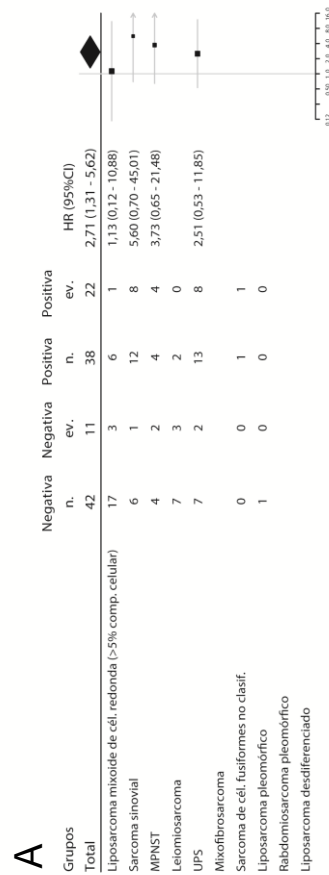
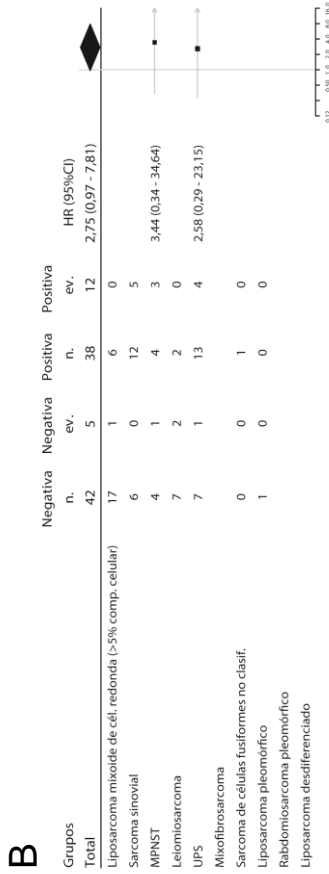
**Figura 12: Análisis de supervivencia en el brazo experimental de tratamiento.** (A) SLP de acuerdo con la expresión de MRP-1, estando la expresión agrupada como baja ( $\leq 25\%$  células positivas) vs. alta ( $> 25\%$  células positivas). (B) SLP de acuerdo con la intensidad de inmunotinción de MRP-1, agrupada como intensidad negativa/débil (0, + o ++) o intensidad alta (+++ o ++++). (C) SG de acuerdo con la expresión de MRP-1, estando la expresión agrupada como baja ( $\leq 25\%$  células positivas) vs. alta ( $> 25\%$  células positivas). (D) SG de acuerdo con la intensidad de inmunotinción de MRP-1, agrupada como intensidad negativa/débil (0, + o ++) o intensidad alta (+++ o ++++).

A diferencia de dichos pacientes, no se observó ninguna relevancia pronóstica ni predictiva en los pacientes asignados aleatoriamente al brazo de tratamiento experimental, tanto con la expresión como con la intensidad de MRP-1 (Figura 12). De la misma manera, no se vieron diferencias significativas en la expresión o intensidad de MRP-1 en el grupo de pacientes registrados tratados con quimioterapia estándar (Figura 13). En este conjunto de pacientes, el subtipo más representado fue mixofibrosarcoma (37%) para el cual la expresión de MRP-1 no mostró una fiabilidad consistente (Figura 14). Ningún paciente con mixofibrosarcoma fue incluido en ninguno de los brazos randomizados.



**Figura 13: Análisis de supervivencia en la cohorte de pacientes de registro.** (A) SLP de acuerdo con la expresión de MRP-1, estando la expresión agrupada como baja ( $\leq 25\%$  células positivas) vs. alta ( $> 25\%$  células positivas). (B) SLP de acuerdo con la intensidad de inmunotinción de MRP-1, agrupada como intensidad negativa/débil (0, + o ++ ) o intensidad alta (+++ o ++++). (C) SG de acuerdo con la expresión de MRP-1, estando la expresión agrupada como baja ( $\leq 25\%$  células positivas) vs. alta ( $> 25\%$  células positivas). (D) SG de acuerdo con la intensidad de inmunotinción de MRP-1, agrupada como intensidad negativa/débil (0, + o ++ ) o intensidad alta (+++ o ++++).





**Figura 14: Gráfico de árbol por subgrupos histológicos.** (A) SLP de acuerdo con la expresión de MRP-1 en el brazo estándar de tratamiento. (B) SG de acuerdo con la expresión de MRP-1 en el brazo estándar de tratamiento. (C) SLP de acuerdo con la expresión de MRP-1 en el brazo experimental de tratamiento. (D) SG de acuerdo con la expresión de MRP-1 en el brazo experimental de tratamiento. (E) SLP de acuerdo con la expresión de MRP1 en la cohorte de registro de pacientes. (F) SG de acuerdo con la expresión de MRP-1 en la cohorte de registro de pacientes. La expresión de MRP-1 se agrupó en baja ( $\leq 25\%$  de células positivas) versus alta ( $>25\%$  de células positivas). LPS: Liposarcoma; MPNST: Tumor de vaina nerviosa periférica; UPS: Sarcoma pleomórfico indiferenciado.

En la serie total, las variables como el estado del paciente según la escala ECOG, el género, la edad, el tamaño y la localización tumoral no tuvieron influencia sobre el pronóstico, mientras que la respuesta RECIST de los pacientes al tratamiento si tuvo una influencia pronóstica tanto en la SLP como en la SG (Tabla S1).

La alta intensidad de expresión de MRP-1 fue el único factor predictivo/pronóstico independiente asociado a la SLP [HR=1,78 (95% CI, 1,11-2,83)],  $p=0,016$  en el análisis multivariante, mostrando también una tendencia para la SG [HR=1,78 (95% CI, 0,97-3,25)],  $p=0,062$  (Tabla 10).

**Tabla 10: Análisis multivariante de factores afectando a la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.**

Variable	SLP		SG	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>Intensidad positiva de MRP-1</b>	1,78 (1,11-2,83)	0,016	1,78 (0,97-3,25)	0,062
<b>ECOG 1</b>	1,37 (0,80-2,35)	0,246	1,64 (0,83-3,23)	0,152
<b>Tamaño tumoral</b>	1,00 (0,99-1,01)	0,397	1,00 (0,99-1,01)	0,990
<b>Edad</b>	0,99 (0,97-1,01)	0,373	0,99 (0,97-1,02)	0,634

## 2. Expresión de *ABCB1*, *ABCC1* y *ABCG2* en un panel de líneas de sarcomas de partes blandas.

La expresión de MRP-1 fue caracterizada en un panel de 5 líneas celulares de SPB: SK-UT-1, CP0024, SW872, SW982 e ICP60. Estudiamos la expresión génica, en niveles de ARN mensajero (ARNm) de dichas bombas: *ABCC1*, el gen que codifica la proteína MRP-1, se expresó en todas las líneas celulares testadas, siendo SK-UT-1 y CP0024 las que expresaron niveles más altos del dicho gen:  $0,030 \pm 0,009$  y  $0,023 \pm 0,005$ , respectivamente, en comparación a las otras líneas celulares utilizadas. Por otro lado, mostraron una menor expresión de *ABCB1* ( $2,137E^{-05} \pm 5,263E^{-07}$  y  $3,575E^{-05} \pm 2,582E^{-05}$ , respectivamente) o *ABCG2* ( $3,725E^{-04} \pm 4,592E^{-05}$  y  $1,072E^{-04} \pm 2,553E^{-06}$ ), en comparación con SW872, SW982 e ICP060 (Figura 15).

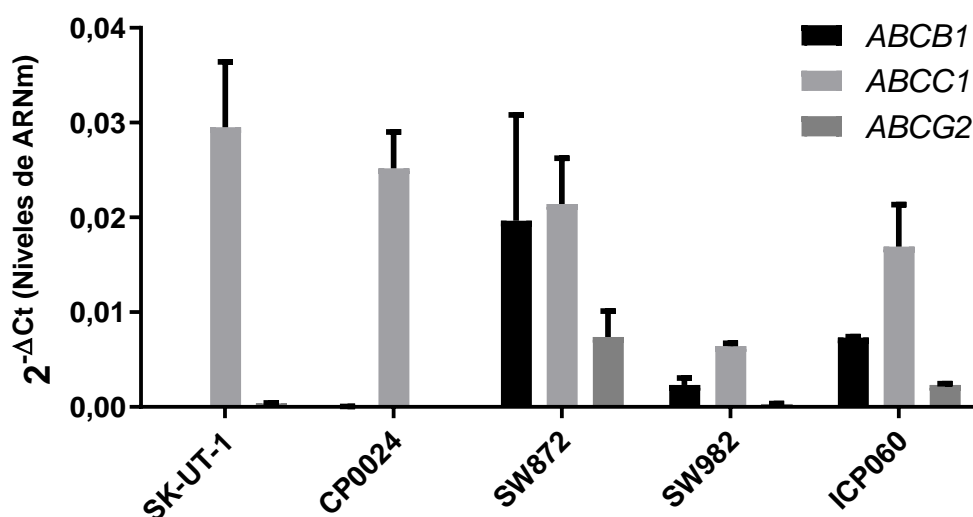


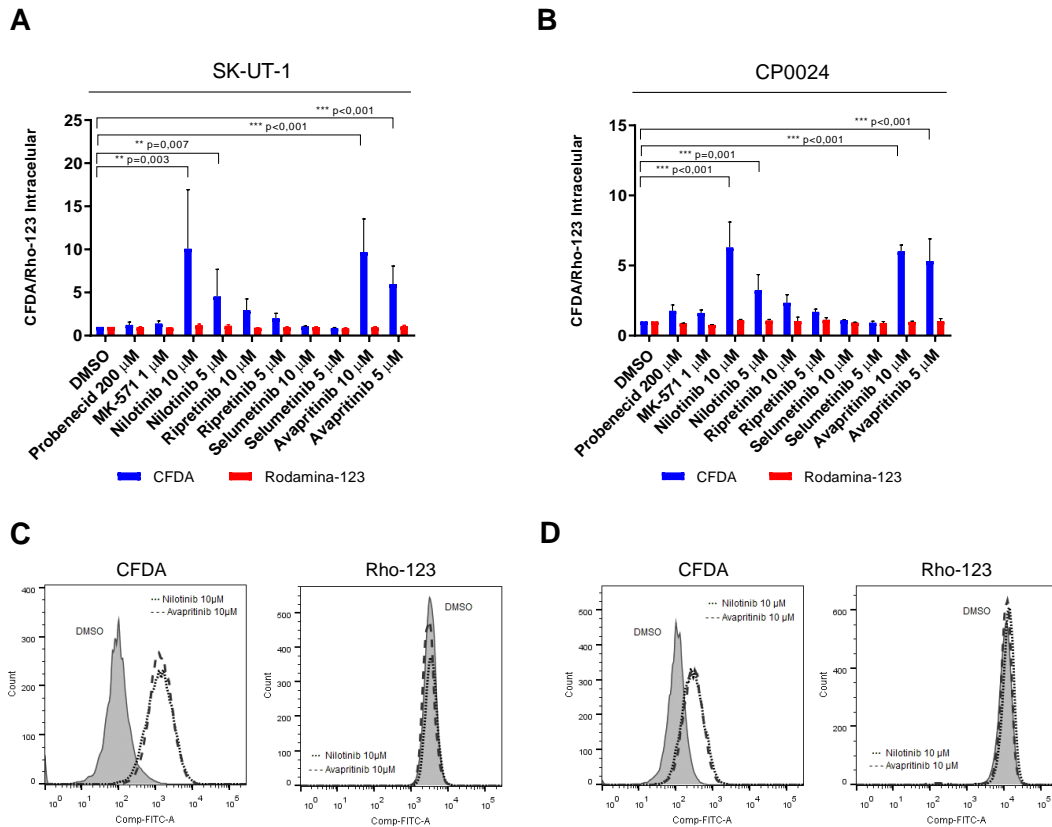
Figura 15: Expresión de las bombas de eflujo *ABCB1*, *ABCC1* y *ABCG2* en un panel de líneas de sarcomas de partes blandas. La expresión génica relativa fue determinada con el método  $2^{-\Delta Ct}$ .

## 3. Estudio de la inhibición en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp por los fármacos seleccionados.

Una vez caracterizadas las líneas celulares en cuanto a la expresión de los transportadores ABC, se evaluó el efecto de diferentes compuestos e inhibidores de tirosina quinasa sobre la actividad de las bombas de eflujo, utilizando las sustancias fluorescentes CFDA y Rho-123 como sustratos de MRP-1 o P-gp, respectivamente. En el panel de líneas celulares de SPB utilizado, observamos que nilotinib y avapritinib fueron capaces de reducir el eflujo de CFDA, aumentando consecuentemente su concentración intracelular. En la línea celular SK-UT-1, la fluorescencia intracelular de CFDA fue  $10,08 \pm 6,85$  veces ( $p = 0,003$ ) y  $4,54 \pm 3,15$  veces ( $p=0,007$ ) superior, en comparación con el control tratado con DMSO, cuando las células se trataron con 10 o

5  $\mu\text{M}$  de nilotinib, respectivamente. En la misma línea celular, la retención de CFDA fue  $9,69 \pm 3,84$  veces ( $p < 0,001$ ) y  $7,82 \pm 4,12$  veces ( $p < 0,001$ ) mayor con respecto al tratamiento con DMSO, cuando las células se trataron con avapritinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 16A,C). También se obtuvieron resultados similares en la línea celular de LMS CP0024: el aumento de la fluorescencia intracelular de CFDA fue de  $6,29 \pm 1,82$  veces ( $p < 0,001$ ) y  $3,23 \pm 1,13$  ( $p = 0,001$ ) mayor en comparación con el tratamiento con DMSO, con nilotinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente y  $6,00 \pm 0,47$  veces ( $p < 0,001$ ) y  $5,32 \pm 1,58$  veces mayor ( $p < 0,001$ ) con avapritinib 10 y 5  $\mu\text{M}$  (Figura 16B,D). El inhibidor de MRP-1 probenecid, que se utilizó como control positivo, indujo un aumento del CFDA intracelular de  $1,24 \pm 0,32$  veces ( $p = 0,04$ ) en SK-UT-1 y  $1,77 \pm 0,42$  ( $p = 0,002$ ) veces en CP0024, en relación con las células tratadas con DMSO. MK-571, también utilizado como control positivo, produjo un aumento de  $1,38 \pm 0,33$  ( $p = 0,006$ ) y  $1,62 \pm 0,22$  ( $p < 0,001$ ) veces, respectivamente en SK-UT-1 y CP0024.

Los efectos de ripretinib y selumetinib en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024 también se muestran en la tabla 11 y la figura 16A-B. Por otro lado, el eflujo de Rho-123 no fue alterado significativamente por ninguna de las moléculas utilizadas en ambas líneas celulares (Tabla 11). En la línea celular SK-UT-1, la acumulación intracelular de Rho-123, en comparación con las células tratadas con DMSO, fue  $0,96 \pm 0,07$  con probenecid 200  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,179$ );  $0,92 \pm 0,004$  con MK-571 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ );  $1,18 \pm 0,17$  ( $p = 0,015$ ) y  $1,15 \pm 0,11$  ( $p = 0,005$ ), con nilotinib 10 y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente;  $0,92 \pm 0,01$  y  $0,95 \pm 0,07$  con 10 y 5  $\mu\text{M}$  de ripretinib ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ );  $0,99 \pm 0,06$  ( $p = 0,486$ ) y  $0,83 \pm 0,08$  ( $p < 0,001$ ) con selumetinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente; y  $0,94 \pm 0,09$  ( $p = 0,056$ ) y  $1,07 \pm 0,12$  ( $p = 0,085$ ) con avapritinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 16A). En la línea celular CP0024 fue  $0,88 \pm 0,02$  con probenecid 200  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,018$ );  $0,77 \pm 0,02$  con MK-571 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ );  $1,09 \pm 0,06$  ( $p = 0,010$ ) y  $1,07 \pm 0,09$  ( $p = 0,106$ ) con nilotinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente;  $1,05 \pm 0,27$  ( $p = 0,661$ ) y  $1,13 \pm 0,15$  ( $p = 0,079$ ) con ripretinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente;  $0,93 \pm 0,02$  ( $p < 0,001$ ) y  $0,91 \pm 0,1$  ( $p = 0,056$ ) con selumetinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente; y  $0,99 \pm 0,05$  ( $p = 0,464$ ) y  $1,03 \pm 0,19$  ( $p = 0,690$ ) con avapritinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 16B). Cuando se aplicó una puntuación al efecto inhibidor de MRP-1 de estos fármacos, avapritinib y nilotinib fueron los inhibidores más eficaces de esta bomba de eflujo, con una media de 6,62 y 5,18 veces más retención de CFDA que el control en el panel de líneas celulares utilizado (Tabla 11). La puntuación de inhibición de MRP-1 se obtuvo después de calcular la media de retención de CFDA de todas las líneas celulares para cada inhibidor. Así pues, el valor más alto denota una mayor actividad inhibitoria sobre MRP-1.

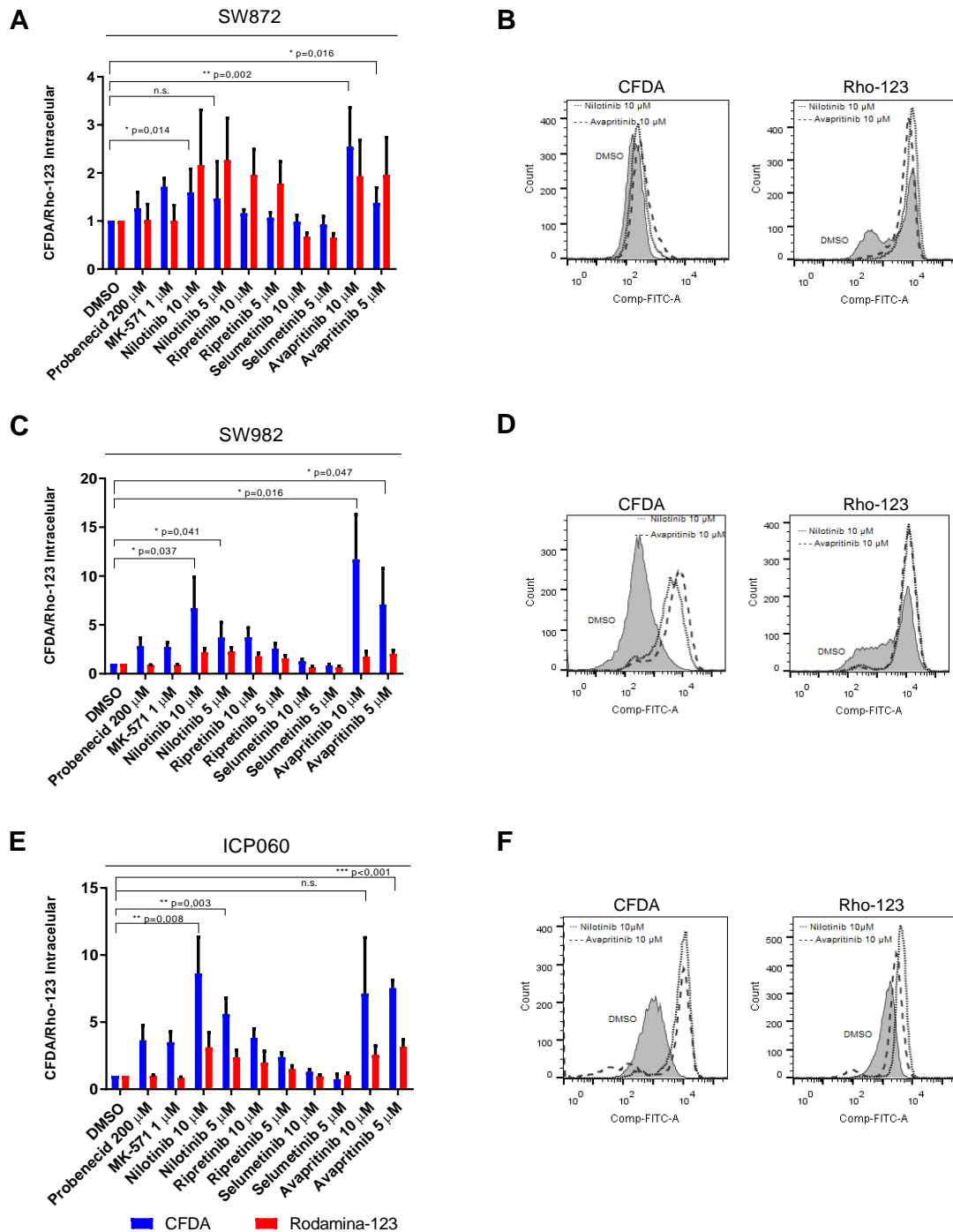


**Figura 16: Efecto inhibitorio de los fármacos seleccionados en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024.** (A) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular SK-UT-1. Las células se trataron con vehículo (DMSO), probenecid 200  $\mu$ M, MK-571 1  $\mu$ M, nilotinib 10 y 5  $\mu$ M, ripretinib 10 y 5  $\mu$ M, selumetinib 10 y 5  $\mu$ M y avapritinib 10 y 5  $\mu$ M (media  $\pm$  DE). (B) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular CP0024. Las células se trataron con los mismos compuestos y concentraciones que en A (media  $\pm$  DE). (C) Gráfico de citometría de flujo que muestra CFDA intracelular (panel izquierdo) y Rho-123 (panel derecho) cuando SK-UT-1 se trató con nilotinib 10  $\mu$ M o avapritinib 10  $\mu$ M en comparación con DMSO (gráfico gris). (D) Gráfico de citometría de flujo que muestra CFDA intracelular (panel izquierdo) y Rho-123 (panel derecho) cuando se trató CP0024 con nilotinib 10  $\mu$ M o avapritinib 10  $\mu$ M en comparación con DMSO (gráfico gris). Test t de Student para datos no pareados: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ . CFDA: diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína; DE: Desviación estándar; Rho-123: rodamina-123.

**Tabla 11: Efecto inhibitorio de los fármacos seleccionados en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp.** La actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp se analizó midiendo la fluorescencia intracelular de CFDA y rodamina-123 en SK-UT-1, CP0024, SW872, SW982 e ICP060. La concentración de fármacos se expresó en  $\mu$ M. El valor representado es la media de la fluorescencia de 3 experimentos diferentes en comparación con las células control con DMSO y la desviación estándar asociada (media  $\pm$  DE). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . La puntuación de inhibición de MRP-1 se obtuvo después de calcular la media de retención de CFDA de todas las líneas celulares para cada inhibidor, dividida por la retención de CFDA obtenida de DMSO, siendo el valor más alto el inhibidor de MRP-1 más activo. DE: Desviación estándar.

Tratamiento	(µM)	Línea celular												Puntuación de inhibición sobre MRP-1		
		SK-UT-1			CP0024			SW872			SW982				ICP060	
		CFDA	Rodamina-123	CFDA	Rodamina-123	CFDA	Rodamina-123	CFDA	Rodamina-123	CFDA	Rodamina-123	CFDA	Rodamina-123		CFDA	Rodamina-123
<b>DMSO</b>		1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	1, 00 ± 0	-
<b>Probenecid</b>	200	1,24 ± 0,32 (p=0,044)	0,96 ± 0,07 (p=0,179)	1,77 ± 0,42 (p=0,018)	0,88 ± 0,02 (p<0,001)	1,26 ± 0,34 (p=0,059)	1,01 ± 0,33 (p=0,890)	2,83 ± 1,13 (p=0,019)	0,89 ± 0,02 (p<0,001)	3,64 ± 1,51 (p=0,015)	1,01 ± 0,03 (p=0,504)	1,01 ± 0,03 (p=0,504)	3,64 ± 1,51 (p=0,015)	1,01 ± 0,03 (p=0,504)	1,01 ± 0,03 (p=0,504)	Control positivo
<b>MK-571</b>	1	1,38 ± 0,33 (p=0,006)	0,92 ± 0,004 (p<0,001)	1,62 ± 0,22 (p<0,001)	0,77 ± 0,02 (p<0,001)	1,71 ± 0,18 (p<0,001)	1,00 ± 0,32 (p=0,969)	2,70 ± 0,66 (p=0,004)	0,91 ± 0,03 (p=0,003)	3,51 ± 0,90 (p=0,005)	0,84 ± 0,08 (p<0,001)	0,84 ± 0,08 (p<0,001)	3,51 ± 0,90 (p=0,005)	0,84 ± 0,08 (p<0,001)	0,84 ± 0,08 (p<0,001)	Control positivo
	10	9,69 ± 3,84 (p<0,001)	0,94 ± 0,09 (p=0,056)	6,00 ± 0,47 (p<0,001)	0,99 ± 0,05 (p=0,464)	2,54 ± 0,82 (p=0,001)	1,93 ± 0,75 (p=0,021)	11,71 ± 4,58 (p=0,016)	1,74 ± 0,56 (p=0,010)	7,13 ± 4,17 (p=0,064)	2,56 ± 0,67 (p<0,001)	2,56 ± 0,67 (p<0,001)	7,13 ± 4,17 (p=0,064)	2,56 ± 0,67 (p<0,001)	2,56 ± 0,67 (p<0,001)	Primer (6,62)
<b>Avapritinib</b>	5	7,82 ± 4,12 (p<0,001)	1,07 ± 0,12 (p=0,085)	5,32 ± 1,58 (p<0,001)	1,03 ± 0,19 (p=0,690)	1,38 ± 0,32 (p=0,016)	1,96 ± 0,78 (p=0,022)	7,07 ± 3,70 (p=0,047)	2,04 ± 0,37 (p<0,001)	7,53 ± 0,60 (p<0,001)	3,14 ± 0,54 (p<0,001)	3,14 ± 0,54 (p<0,001)	7,53 ± 0,60 (p<0,001)	3,14 ± 0,54 (p<0,001)	3,14 ± 0,54 (p<0,001)	Primer (6,62)
	10	10,08 ± 6,85 (p=0,003)	1,18 ± 0,17 (p=0,015)	6,29 ± 1,82 (p<0,001)	1,09 ± 0,06 (p=0,010)	1,60 ± 0,49 (p=0,014)	2,16 ± 1,15 (p=0,055)	6,70 ± 3,21 (p=0,037)	2,19 ± 0,37 (p<0,001)	8,61 ± 5,59 (p=0,008)	3,12 ± 1,09 (p=0,001)	3,12 ± 1,09 (p=0,001)	8,61 ± 5,59 (p=0,008)	3,12 ± 1,09 (p=0,001)	3,12 ± 1,09 (p=0,001)	Segundo (5,18)
<b>Nilotinib</b>	5	4,54 ± 3,15 (p=0,007)	1,15 ± 0,11 (p=0,005)	3,23 ± 1,13 (p<0,001)	1,07 ± 0,09 (p=0,106)	1,47 ± 0,76 (p=0,165)	2,26 ± 0,88 (p=0,013)	3,69 ± 1,57 (p=0,041)	2,26 ± 0,43 (p<0,001)	5,59 ± 1,19 (p=0,003)	2,38 ± 0,52 (p<0,001)	2,38 ± 0,52 (p<0,001)	5,59 ± 1,19 (p=0,003)	2,38 ± 0,52 (p<0,001)	2,38 ± 0,52 (p<0,001)	Segundo (5,18)
	10	2,93 ± 1,34 (p=0,002)	0,92 ± 0,01 (p<0,001)	2,34 ± 0,57 (p<0,001)	1,05 ± 0,27 (p=0,661)	1,16 ± 0,08 (p<0,001)	1,95 ± 0,53 (p=0,005)	3,74 ± 0,96 (p=0,008)	1,78 ± 0,35 (p<0,001)	3,81 ± 0,69 (p=0,002)	1,98 ± 0,85 (p=0,019)	1,98 ± 0,85 (p=0,019)	3,81 ± 0,69 (p=0,002)	1,98 ± 0,85 (p=0,019)	1,98 ± 0,85 (p=0,019)	Tercero (2,37)
<b>Ripretinib</b>	5	1,99 ± 0,59 (p<0,001)	0,95 ± 0,07 (p=0,043)	1,69 ± 0,20 (p<0,001)	1,13 ± 0,15 (p=0,079)	1,07 ± 0,11 (p=0,136)	1,77 ± 0,47 (p=0,007)	2,57 ± 0,53 (p=0,007)	1,56 ± 0,30 (p=0,002)	2,39 ± 0,33 (p=0,002)	1,50 ± 0,26 (p=0,001)	1,50 ± 0,26 (p=0,001)	2,39 ± 0,33 (p=0,002)	1,50 ± 0,26 (p=0,001)	1,50 ± 0,26 (p=0,001)	Tercero (2,37)
	10	1,07 ± 0,03 (p<0,001)	0,99 ± 0,06 (p=0,486)	1,09 ± 0,05 (p=0,001)	0,93 ± 0,02 (p<0,001)	0,99 ± 0,13 (p=0,812)	0,67 ± 0,08 (p<0,001)	1,28 ± 0,21 (p=0,093)	0,64 ± 0,10 (p<0,001)	1,30 ± 0,19 (p=0,049)	0,96 ± 0,12 (p=0,420)	0,96 ± 0,12 (p=0,420)	1,30 ± 0,19 (p=0,049)	0,96 ± 0,12 (p=0,420)	0,96 ± 0,12 (p=0,420)	Cuarto (0,99)
<b>Selumetinib</b>	5	0,86 ± 0,09 (p<0,001)	0,83 ± 0,08 (p<0,001)	0,91 ± 0,12 (p=0,105)	0,91 ± 0,1 (p=0,056)	0,93 ± 0,17 (p=0,290)	0,65 ± 0,09 (p<0,001)	0,82 ± 0,14 (p=0,105)	0,67 ± 0,09 (p<0,001)	0,74 ± 0,40 (p=0,307)	1,04 ± 0,18 (p=0,608)	1,04 ± 0,18 (p=0,608)	0,74 ± 0,40 (p=0,307)	1,04 ± 0,18 (p=0,608)	1,04 ± 0,18 (p=0,608)	Cuarto (0,99)

El efecto de nilotinib y avapritinib en la acumulación intracelular de CFDA fue similar en ICP060, SW872 y SW982 (Figura 17 – Tabla 11), sin embargo se observó un efecto de los inhibidores sobre la fluorescencia intracelular de Rho-123 excepcionalmente en la línea SW872. Tanto nilotinib como avapritinib fueron capaces de retener CFDA intracelular de manera más eficiente en comparación con los otros inhibidores probados. En la línea celular SW982, la retención intracelular de CFDA fue  $6,70 \pm 3,21$  veces ( $p=0,004$ ) y  $3,69 \pm 1,57$  veces ( $p=0,040$ ) superior, en comparación con las células control tratadas con DMSO, cuando se utilizaron concentraciones de nilotinib de 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. En la misma línea celular, la retención de CFDA fue  $11,71 \pm 4,58$  veces ( $p=0,020$ ) y  $7,07 \pm 3,70$  veces ( $p=0,050$ ) mayor, en comparación con el tratamiento con DMSO, cuando las células se trataron con avapritinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. También se obtuvieron resultados similares en la línea celular ICP060: el aumento en la retención intracelular de CFDA fue de  $8,61 \pm 2,73$  veces ( $p=0,008$ ) y  $5,59 \pm 1,19$  ( $p=0,003$ ) veces mayor en comparación con el tratamiento con DMSO, con 10 y 5  $\mu\text{M}$  de nilotinib, respectivamente, y  $7,13 \pm 4,17$  veces y  $7,53 \pm 0,6$  veces ( $p=0,050$ ) superior con avapritinib 10 y 5  $\mu\text{M}$ . El inhibidor de MRP-1 probenecid, que se utilizó como control positivo, indujo un aumento del CFDA intracelular de  $2,84 \pm 0,83$  veces ( $p=0,01$ ) en SW982 y  $3,64 \pm 1,51$  veces ( $p=0,01$ ) en ICP060 en relación con las células tratadas con DMSO. Por el contrario, los otros inhibidores utilizados no mostraron un efecto inhibitorio claro sobre MRP-1 y, además, el eflujo de Rho-123 no fue prácticamente alterado por ninguna de las moléculas probadas en las líneas celulares SW982 e ICP060. Sin embargo, en SW872 no pudimos ver diferencias tan significativas en términos de fluorescencia intracelular de CFDA o Rho-123 con los inhibidores y el control con DMSO (Figura 17, Tabla 11). Por tanto, gracias a la fluorescencia intracelular de CFDA, se observó que la actividad de la bomba de eflujo MRP-1 se ve alterada por los inhibidores tirosina quinasa nilotinib y avapritinib en todas las líneas celulares de estudio.

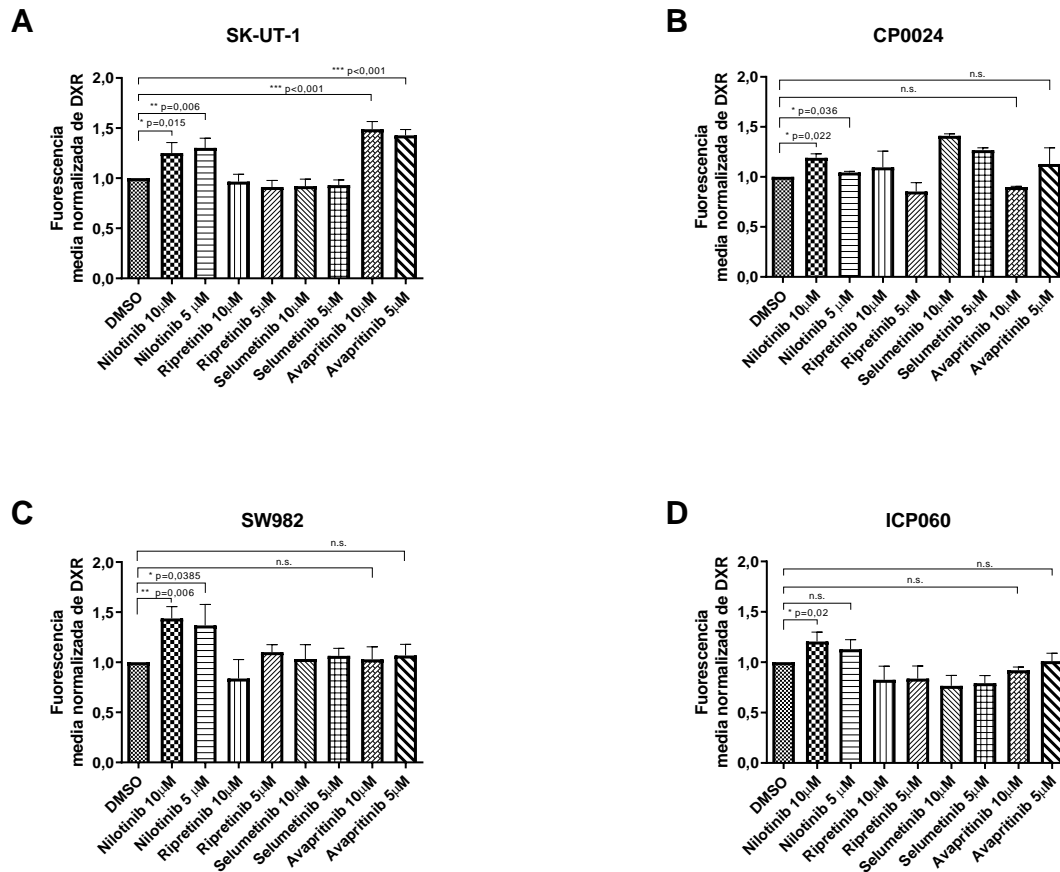


**Figura 17: Efecto inhibitor de los fármacos seleccionados en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp en líneas celulares SW872, SW982 e ICP060.** (A) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular SW872. Las células se trataron con vehículo (DMSO), probenecid 200  $\mu$ M, MK-571 1  $\mu$ M, nilotinib 10 y 5  $\mu$ M, ripretinib 10 y 5  $\mu$ M, selumetinib 10 y 5  $\mu$ M y avapritinib 10 y 5  $\mu$ M. (media  $\pm$  DE) (B) Gráfico de citometría de flujo que muestra CFDA intracelular (panel izquierdo) y Rho-123 (panel derecho) cuando SW872 se trató con nilotinib 10  $\mu$ M o avapritinib 10  $\mu$ M en comparación con DMSO (gráfico gris). (C) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular SW982. Las células se trataron con los mismos compuestos y concentraciones que en A. (media  $\pm$  DE). (D) Gráfico de citometría de flujo que muestra CFDA intracelular (panel izquierdo) y Rho-123 (panel derecho) cuando SW982 se trató con nilotinib 10  $\mu$ M o avapritinib 10  $\mu$ M en comparación con DMSO (gráfico gris). (E) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular ICP060. Las células se trataron con los mismos compuestos y concentraciones que en A y C. (media  $\pm$  DE). (F) Gráfico de citometría de flujo que muestra CFDA intracelular (panel izquierdo) y Rho-123 (panel derecho) cuando ICP060 se trató con nilotinib 10  $\mu$ M o avapritinib 10  $\mu$ M en comparación con DMSO (gráfico gris). Test t de Student para datos no pareados: \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005. CFDA: diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína; DE: Desviación estándar Rho-123: rodamina-123.



#### 4. Estudio de la retención de doxorubicina tras el tratamiento con los inhibidores seleccionados en SPB.

La doxorubicina posee una característica singular de autofluorescencia que permite determinar, mediante citometría de flujo, la cantidad de dicho compuesto que es capaz de retener las células. La retención de doxorubicina se determinó en SK-UT-1, CP0024, SW892 e ICP060, eliminando así SW872, línea celular donde los inhibidores no mostraban un efecto evidente. Se trataron las células con los inhibidores 24 h antes de la adición de la doxorubicina y tras otras 24 h se midió la autofluorescencia de la doxorubicina por citometría de flujo. En la línea celular SK-UT-1, avapritinib fue capaz de aumentar la acumulación de doxorubicina intracelular tras 48 h de tratamiento:  $1,49 \pm 0,07$  veces ( $p < 0,001$ ) con avapritinib  $10 \mu\text{M}$  y  $1,43 \pm 0,06$  veces ( $p < 0,001$ ) con  $5 \mu\text{M}$  avapritinib (Figura 18A). El efecto de avapritinib sobre la acumulación intracelular de doxorubicina no fue significativo en CP0024 (Figura 18B), ni con  $10 \mu\text{M}$  ni con  $5 \mu\text{M}$ , aunque se observó una tendencia con esta última ( $1,13 \pm 0,16$  veces). Por otro lado, nilotinib fue capaz de aumentar la acumulación de doxorubicina en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024:  $1,25 \pm 0,10$  veces ( $p = 0,015$ ) con nilotinib  $10 \mu\text{M}$  y  $1,30 \pm 0,1$  veces ( $p = 0,006$ ) con  $5 \mu\text{M}$  nilotinib en células SK-UT-1 y  $1,19 \pm 0,04$  veces ( $p = 0,022$ ) con nilotinib  $10 \mu\text{M}$  y  $1,04 \pm 0,01$  veces ( $p = 0,036$ ) con nilotinib  $5 \mu\text{M}$  en CP0024 (Figura 18A-B). En SW982 e ICP060, se observó el mismo efecto que en la línea celular CP0024: avapritinib fue incapaz de aumentar la concentración intracelular de doxorubicina, ni a  $10$  ni  $5 \mu\text{M}$  (para SW982  $1,03 \pm 0,07$  con el tratamiento de avapritinib  $10 \mu\text{M}$  y  $1,07 \pm 0,06$  veces con avapritinib  $5 \mu\text{M}$ ; para ICP060  $0,09 \pm 0,02$  con avapritinib  $10 \mu\text{M}$  y  $1,01 \pm 0,05$  con  $5 \mu\text{M}$ ) (Figura 18C-D). Por el contrario, nilotinib, tanto a  $10$  como  $5 \mu\text{M}$  d concentración fue capaz de aumentar la concentración intracelular de doxorubicina, siendo este aumento en SW892 de  $1,44 \pm 0,08$  veces ( $p = 0,006$ ) y  $1,37 \pm 0,12$  veces ( $p = 0,039$ ) con  $10$  y  $5 \mu\text{M}$  de nilotinib respectivamente. En ICP060 se produjo un aumento de  $1,21 \pm 0,05$  ( $p = 0,02$ ) veces con nilotinib  $10 \mu\text{M}$  y se observó una tendencia al tratar con  $5 \mu\text{M}$  ( $1,13 \pm 0,05$  veces ( $p = 0,08$ )) (Figura 18C-D). Por consiguiente, de los fármacos seleccionados, solamente avapritinib en alguna de las líneas y nilotinib mostraron actividad sobre la retención de doxorubicina en el interior celular, haciéndolos los más adecuados para continuar en el estudio.

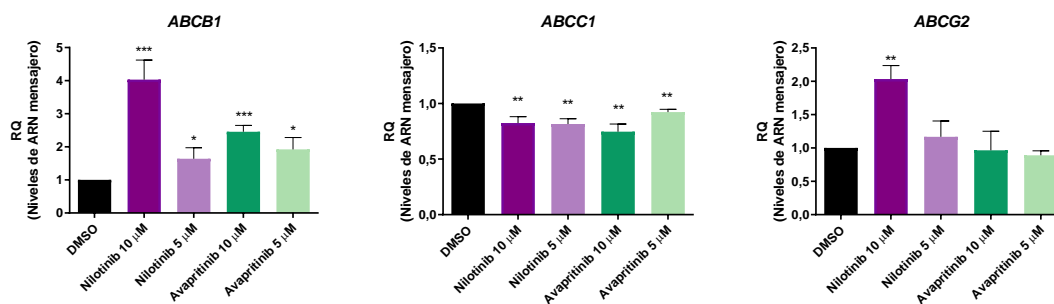


**Figura 18. Acumulación intracelular de doxorubicina tras el tratamiento con los fármacos seleccionados.** (A) Fluorescencia intracelular media de doxorubicina en la línea celular SK-UT-1 tras el tratamiento durante 48 horas con vehículo (DMSO), nilotinib 10 y 5  $\mu$ M, ripretinib 10 y 5  $\mu$ M, selumetinib 10 y 5  $\mu$ M y avapritinib 10 y 5  $\mu$ M. (B) Fluorescencia intracelular media de doxorubicina en la línea celular CP0024 tras el tratamiento durante 48 horas con vehículo (DMSO), nilotinib 10 y 5  $\mu$ M, ripretinib 10 y 5  $\mu$ M, selumetinib 10 y 5  $\mu$ M y avapritinib 10 y 5  $\mu$ M. (C) Fluorescencia intracelular media de doxorubicina en la línea celular SW982 tras el tratamiento durante 48 horas con los mismos compuesto que en A y B. (D) Fluorescencia intracelular media de doxorubicina en la línea celular ICP060 tras el tratamiento durante 48 horas con los mismos compuesto que en A y B. El valor representado media de la fluorescencia de doxorubicina de 3 experimentos diferentes en comparación con las células control con DMSO y la desviación estándar asociada (media  $\pm$  DE). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . DXR: Doxorubicina. DE: Desviación estándar

## 5. Estudio de la expresión de las bombas de eflujo tras el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa.

Para finalizar la caracterización del efecto de los inhibidores sobre los transportadores ABC, quisimos comprobar si los dos inhibidores tirosina quinasa con mayor actividad alteraban los niveles de expresión génicos de dichas bombas. Si comparamos valores relativos a las células tratadas con el vehículo DMSO en la línea celular CP0024, la expresión de *ABCC1* decrece tanto con el tratamiento con nilotinib como con avapritinib tras 48 h de exposición a ambos. Esto ocurre tanto a 5  $\mu$ M ( $0,82 \pm 0,05$  ( $p=0,002$ ) con nilotinib y  $0,92 \pm 0,02$  ( $p=0,008$ ) con avapritinib) como 10  $\mu$ M de concentración ( $0,82 \pm 0,06$  ( $p=0,008$ ) con nilotinib y  $0,75 \pm 0,07$  ( $p=0,002$ ) con

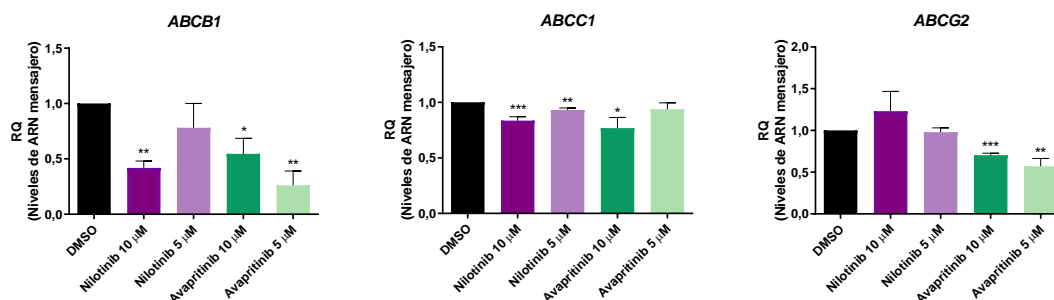
avapritinib. Esta disminución en los niveles de *ABCC1* parece depender de la dosis en el caso de nilotinib, no siendo así tras el tratamiento con avapritinib. No obstante, *ABCB1* y *ABCG2* se comportan de similar manera y contrariamente a *ABCC1*: ambas aumentan sus niveles tras el tratamiento con nilotinib o avapritinib con respecto al control tratado con DMSO, siendo en este caso, con una marcada dependencia de la dosis de TKIs utilizada. *ABCB1* incrementa su expresión a  $4,03 \pm 0,6$  ( $p < 0,001$ ) y a  $1,64 \pm 0,33$  ( $p = 0,041$ ) tras el tratamiento con 10 y 5  $\mu\text{M}$  de nilotinib. Con avapritinib esta subida no es tan acusada alcanzando, aun así, niveles de expresión de  $2,46 \pm 0,19$  ( $p < 0,001$ ) y  $1,92 \pm 0,36$  ( $p = 0,010$ ) con 10 y 5  $\mu\text{M}$  de avapritinib. El aumento de *ABCG2* únicamente alcanzó significancia estadística tras el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de nilotinib ( $2,03 \pm 0,2$ ;  $p = 0,002$ ) (Figura 19).



**Figura 19: Expresión génica relativa de los transportadores ABC tras el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa en la línea celular CP0024.** Se representa la cuantificación relativa al control (DMSO) de los niveles de expresión de ARNm de los transportadores ABC: *ABCB1* (izquierda), *ABCC1* (centro) y *ABCG2* (derecha). El valor representado es la media de 3 experimentos y la desviación estándar de la media asociada (media  $\pm$  SEM). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

En la línea celular SK-UT-1, *ABCC1* mantiene el mismo patrón de expresión que en CP0024 ya que los niveles de expresión de ARN mensajero descienden tanto con nilotinib ( $0,84 \pm 0,04$  ( $p = 0,001$ ) y  $0,93 \pm 0,02$  ( $p = 0,020$ ) con 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente) como con avapritinib ( $0,77 \pm 0,1$  ( $p = 0,040$ ) y  $0,94 \pm 0,06$  ( $p = 0,267$ ) con 10 y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente). No obstante, la expresión de *ABCB1* y *ABCG2* sí varía en relación con CP0024. *ABCB1* disminuye también tras el tratamiento con ambos inhibidores tirosina quinasa: con nilotinib, los valores de expresión con respecto al control disminuyen, pasando a ser  $0,42 \pm 0,06$  ( $p = 0,001$ ) con 10  $\mu\text{M}$  y  $0,78 \pm 0,22$  ( $p = 0,272$ ) con 5  $\mu\text{M}$ ; con avapritinib se observó también una disminución a  $0,55 \pm 0,14$  ( $p = 0,030$ ) y  $0,26 \pm 0,13$  ( $p = 0,005$ ) con 10 y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente. *ABCG2*, sin embargo, no se vio afectado por el tratamiento con nilotinib, pero si se produjo una disminución con

avapritinib ( $0,70 \pm 0,22$  ( $p < 0,001$ ) y  $0,57 \pm 0,09$  ( $p = 0,003$ )) con 10 y 5  $\mu\text{M}$  correspondientemente (Figura 20).

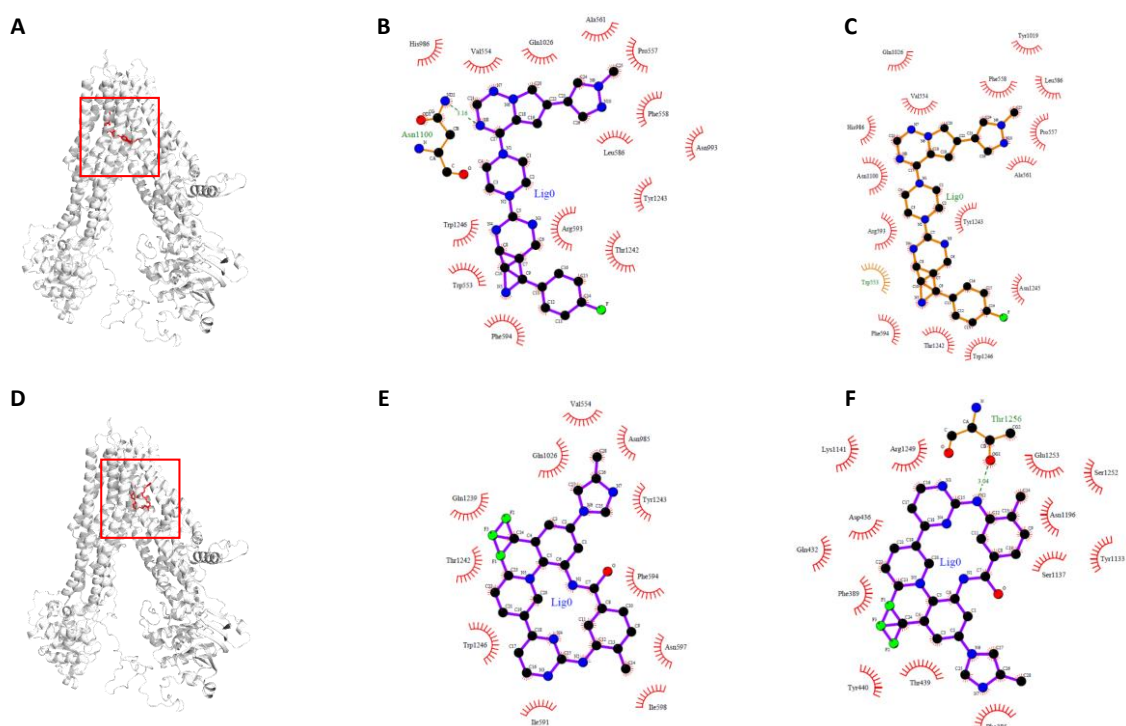


**Figura 20: Expresión génica relativa de los transportadores ABC tras el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa en la línea celular SK-UT-1.** Se representa la cuantificación relativa al control (DMSO) de los niveles de expresión de ARNm de los transportadores ABC: *ABC1* (izquierda), *ABCC1* (centro) y *ABCG2* (derecha). El valor representado es la media de 3 experimentos y la desviación estándar de la media asociada (media  $\pm$  SEM). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

## 6. Análisis *in silico* de los moduladores de MRP-1

Para complementar el estudio de las moléculas inhibitoras de las bombas de eflujo ABC, se realizó un estudio *in silico* de *docking* o acoplamiento molecular, que mide la energía de afinidad de cada una de las moléculas testadas con la estructura tridimensional de los transportadores P-gp, MRP-1 y BCRP. Cuanto menor sea la energía de afinidad entre una molécula y el transportador, mayor es su potencial de interacción. En los resultados obtenidos se observó que todas las moléculas mostraban la menor energía de afinidad para BCRP y la mayor para MRP-1, aunque la energía de afinidad no era elevada en ninguno de los casos estudiados. Dichos resultados se muestran en la tabla 12. Para nuestra bomba de interés, MRP-1, los resultados de acoplamiento *in silico* mostraron que nilotinib (-10,54 kcal/mol) y avapritinib (-9,70 kcal/mol) fueron los dos inhibidores con una media de energía de unión más baja para MRP-1, en comparación con ripretinib (-9,41 kcal/mol), probenecid (-6,91 kcal/mol), MK-571 (-8,57 kcal/mol) y selumetinib (-7,50 kcal/mol). Estos valores corresponden a las energías de afinidad media del mejor acoplamiento entre las estructuras modeladas de MRP-1 utilizadas. Se observó también que nilotinib y avapritinib fueron los inhibidores que mostraron una menor energía de afinidad para cada una de las bombas estudiadas (Tabla 12). El acoplamiento de avapritinib y nilotinib a la proteína MRP-1, así como los residuos de aminoácidos que participan en la unión TKI-proteína se representan en la Figura 21. En el caso de avapritinib (Figura 21A), son los modelos 7 y 3 aquellos que muestran una menor afinidad (-10,5) (Figura 21B-C), interactuando en este último la asparagina 100 (Asn100) de MRP-1 mediante un puente de hidrógeno con la molécula de avapritinib (Figura 21B). Para nilotinib, son los modelos 1 y 16 aquellos con una

menor energía de afinidad (-11,7 y -11,8, respectivamente) (Figura 21E-F), en este último produciéndose una interacción mediante puente de hidrógeno con la treonina 1256 (Thr1256).



**Figura 21: Acoplamiento de avapritinib y nilotinib a la proteína MRP-1.** (A) Acoplamiento de avapritinib a MRP-1. (B) Representación bidimensional del sitio de unión de acoplamiento de avapritinib en el modelo 7 (5uj9.1.A). (C) Representación bidimensional del sitio de unión de acoplamiento de avapritinib en el modelo 3 (5uj9.1.A). (D) Acoplamiento de nilotinib a MRP-1. (E) Representación bidimensional del sitio de unión de acoplamiento de nilotinib en el modelo 16 (5ko2.1.A). (F) Representación bidimensional del sitio de unión de acoplamiento de nilotinib en el modelo 1 (6uy0.1.A). La línea verde entre el fármaco y MRP-1 representa los enlaces de hidrógeno.

**Tabla 12: Energía de afinidad media de los fármacos testados frente a los transportadores ABC.** Cada valor corresponde a la energía de afinidad media de las poses con menor energía del docking rígido para cada una de las estructuras utilizadas para ese transportador (Listado completo en Tabla S2).

	BCRP	P-gp	MRP-1
<b>Nilotinib</b>	-14,26	-11,5	-10,54
<b>Avapritinib</b>	-11,23	-10,42	-9,71
<b>Ripretinib</b>	-10,61	-9,98	-9,41
<b>MK-571</b>	-9,85	-9,22	-8,57
<b>Selumetinib</b>	-8,46	-7,58	-7,50
<b>Probenecid</b>	-7,32	-7,28	-6,91

Con el objetivo de mejorar las predicciones obtenidas se utilizó la herramienta KDeep para predecir la afinidad de unión del complejo proteína-ligando. Previamente, se posicionan tanto proteína como ligando en la conformación de interacción (co-cristalizados o posicionados mediante *docking*) para predecir la afinidad de unión. Los resultados de KDeep nos mostraron una mayor afinidad de nilotinib frente a avapritinib

en los tres transportadores, siendo la mayor frente a BCRP y la menor frente a MRP-1 (Tabla 13).

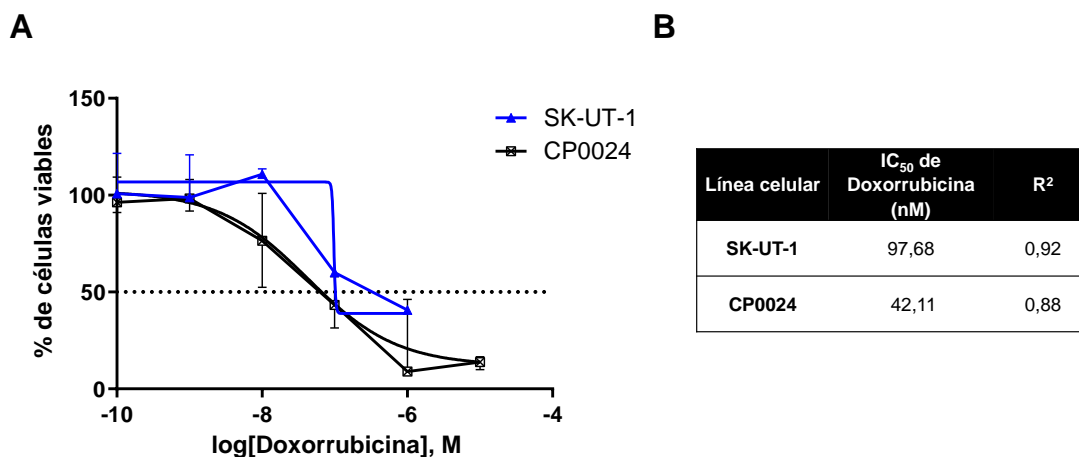
**Tabla 13: Predicción de la afinidad de unión de avapritinib y nilotinib con los transportadores ABC calculado con KDeep.**

Transportador ABC	Ligando	pKd (-LogKd)	$\Delta G$ (kcal/mol)	Eficiencia ligando (kcal/mol)
<b>BCRP</b>	Avapritinib	7,32	-9,88	-0,27
	Nilotinib	7,53	-10,17	-0,26
<b>P-gp</b>	Avapritinib	6,98	-9,42	-0,25
	Nilotinib	7,14	-9,64	-0,25
<b>MRP-1</b>	Avapritinib	6,07	-8,2	-0,22
	Nilotinib	6,85	-9,25	-0,24

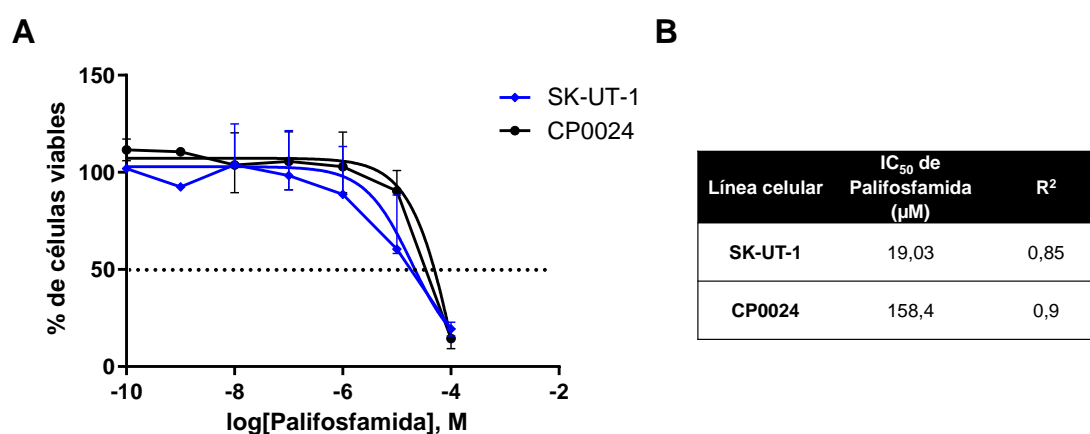
### 7. Estudio de la sensibilidad a quimioterápicos de las líneas de SPB

Tras ver el efecto de los inhibidores tirosina quinasa en nuestras líneas, se estudió la sensibilidad de las dos líneas seleccionadas a doxorubicina, determinando así el IC<sub>50</sub> o concentración inhibitoria en la que mueren el 50% de las células a las 72 horas del tratamiento con doxorubicina. Las líneas de sarcomas mostraron, en general, una alta sensibilidad a doxorubicina alcanzando valores del rango de nanomolar. La línea celular que mostró un IC<sub>50</sub> más bajo para doxorubicina fue la línea de LMS CP0024 (IC<sub>50</sub>: 42,11 nM) siguiéndola, en orden creciente de IC<sub>50</sub>, SK-UT-1 (IC<sub>50</sub>: 105,4 nM) (Figura 22A-B). Además, valores de R<sup>2</sup> cercanos a 1 (0,88-0,99) nos muestran un ajuste fiable de dichos IC<sub>50</sub>.

Por otro lado, se testó palifosfamida, metabolito activo celularmente de la ifosfamida. En este caso, las células mostraron IC<sub>50</sub> superiores a los de doxorubicina, siendo menos sensibles a este fármaco. Así, CP0024 fue la línea que mostró un IC<sub>50</sub> más alto para palifosfamida (IC<sub>50</sub>: 158,4  $\mu$ M) y SK-UT-1, línea celular con el IC<sub>50</sub> más bajo para dicho fármaco (IC<sub>50</sub>: 19,03  $\mu$ M). De nuevo, los valores de R<sup>2</sup> cercanos a 1 nos indican la fiabilidad de los resultados obtenidos (0,82 – 0,9) (Figura 23A-B).



**Figura 22: Estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento con doxorubicina en un panel de líneas de sarcomas.** (A) Curvas de viabilidad celular a las 72 horas de tratamiento con doxorubicina en las líneas SK-UT-1 y CP0024. Los valores representados son la media  $\pm$  error respecto al control con DMSO de tres experimentos independientes. (B) Tabla que recoge los valores numéricos expresados en nM, de los de los IC<sub>50</sub> de doxorubicina en las líneas celulares especificadas y el coeficiente de determinación R<sup>2</sup>.



**Figura 23: Estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento con palifosfamida en un panel de líneas de sarcomas.** (A) Curvas de viabilidad celular a las 72 horas de tratamiento con palifosfamida en las líneas SK-UT-1, CP0024, SW872, SW982 e ICP060. Los valores representados son la media  $\pm$  error respecto al control con DMSO de tres experimentos independientes. (B) Tabla que recoge los valores numéricos, expresados en micromolar ( $\mu$ M), de los IC<sub>50</sub> de palifosfamida en las líneas celulares especificadas y el coeficiente de determinación R<sup>2</sup>.

## 8. Estudio de viabilidad celular tras el tratamiento con la triple combinación de fármacos en SPB.

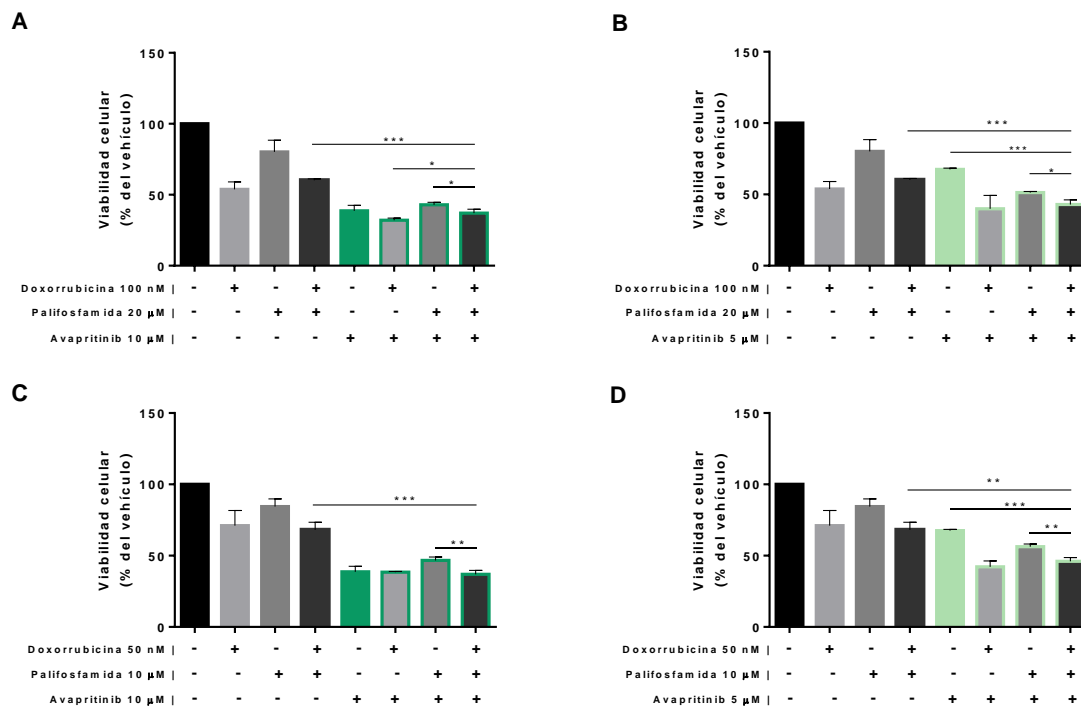
Una vez calculados los IC<sub>50</sub> para los quimioterápicos doxorubicina y palifosfamida, se estudió la viabilidad de una triple combinación de fármacos, utilizando los dos inhibidores de MRP-1 que mostraron una mayor eficacia en el cribado realizado, nilotinib y avapritinib. Por tanto, 24 horas previo al tratamiento con doxorubicina más palifosfamida, se añadió uno de los dos inhibidores tirosina quinasa a concentración de 10 o 5  $\mu$ M. Los agentes quimioterápicos utilizados se testaron a sus concentraciones de IC<sub>50</sub> en proporción 1:1 y a concentraciones más bajas, que corresponden a la mitad del

valor de su IC<sub>50</sub>, también en proporción 1:1. La actividad de la combinación triple avapritinib se obtuvo midiendo la viabilidad celular mediante ensayo MTS a las 72 h de la adición del primer fármaco y se comparó con la doble combinación de doxorubicina y palifosfamida. En la tabla 14 se muestran las concentraciones utilizadas para ambas líneas. Los resultados se expresaron en tanto por cien, siendo 100% el máximo de viabilidad y 0% el mínimo. En la línea celular SK-UT-1, la viabilidad celular disminuyó significativamente, cuando se comparó la combinación triple de avapritinib 10  $\mu$ M y concentraciones de IC<sub>50</sub> de doxorubicina y palifosfamida (37,00  $\pm$  2,72 %) con la doble combinación de concentraciones de IC<sub>50</sub> de doxorubicina y palifosfamida (60,18  $\pm$  1,02 %; p<0,001) (Figura 24A). La viabilidad celular también fue menor cuando disminuimos la concentración de avapritinib a 5  $\mu$ M para la combinación triple frente a la doble (42,9  $\pm$  3,26 %, p <0,001) (Figura 24B). Se obtuvieron resultados similares cuando se trató la misma línea celular SK-UT-1 con concentraciones más bajas de doxorubicina y palifosfamida y en combinación con avapritinib. En consecuencia, la viabilidad celular fue de 36,99  $\pm$  2,67 % para la combinación triple con avapritinib 10  $\mu$ M frente a 68,09  $\pm$  5,35 % para la doble combinación, p <0,001 (Figura 24C); mientras que fue de 46,05  $\pm$  2,58 % para concentraciones más bajas de doxorubicina más palifosfamida y 5  $\mu$ M de avapritinib (Figura 24D).

**Tabla 14: Concentraciones utilizadas para el estudio de la viabilidad celular tras tratamiento con inhibidores tirosina quinasa y quimioterapéuticos**

Fármaco	Línea celular	Concentraciones IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Concentraciones por debajo de IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>Doxorrubicina</b>	SK-UT-1	0,1	0,05
	CP0024	0,05	0,025
<b>Palifosfamida</b>	SK-UT-1	20	10
	CP0024	150	75
<b>Nilotinib</b>	Ambas	10	5
<b>Avapritinib</b>	Ambas	10	5



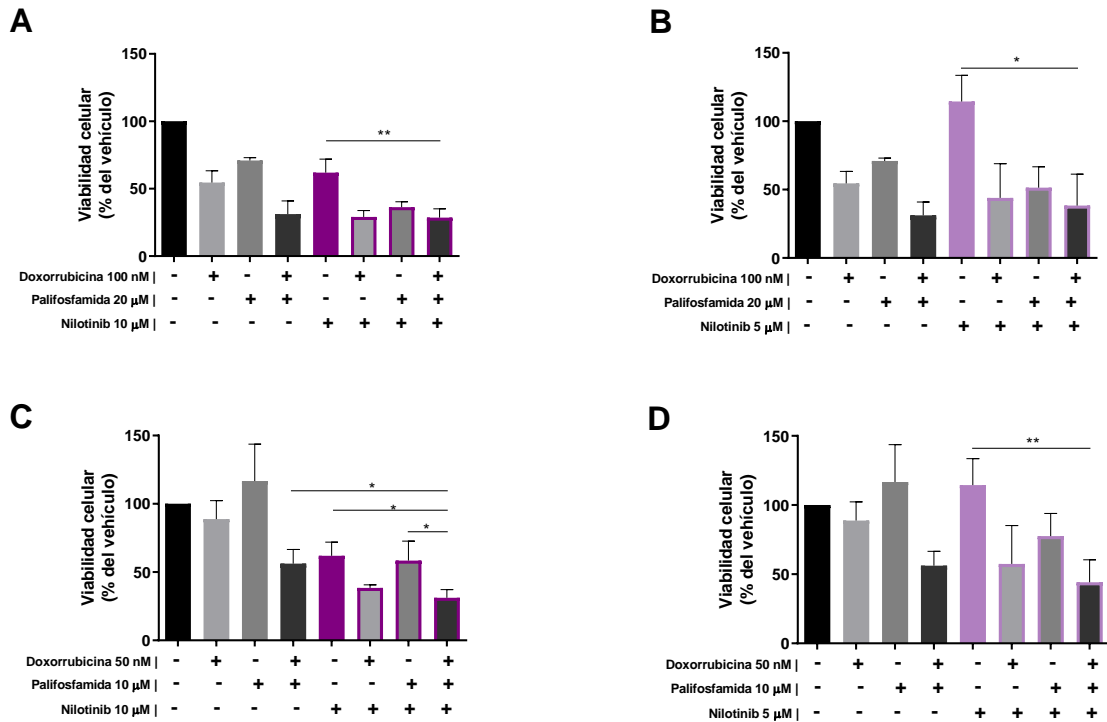


**Figura 24: Viabilidad celular en SK-UT-1 tras el tratamiento con doxorrubicina, palifosfamida y avapritinib.** (A) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con avapritinib 10  $\mu$ M y concentraciones  $IC_{50}$  de doxorrubicina (100 nM) y palifosfamida (20  $\mu$ M). (B) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con avapritinib 5  $\mu$ M y concentraciones  $IC_{50}$  de doxorrubicina (100 nM) y palifosfamida (20  $\mu$ M). (C) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con avapritinib 10  $\mu$ M y concentraciones por debajo del  $IC_{50}$  de doxorrubicina (50 nM) y palifosfamida (10  $\mu$ M). (D) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con avapritinib 5  $\mu$ M y concentraciones por debajo del  $IC_{50}$  de doxorrubicina (50 nM) y palifosfamida (10  $\mu$ M). Los valores representados son el porcentaje de células viables  $\pm$  DE en comparación con el tratamiento con DMSO. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . DE: Desviación estándar.

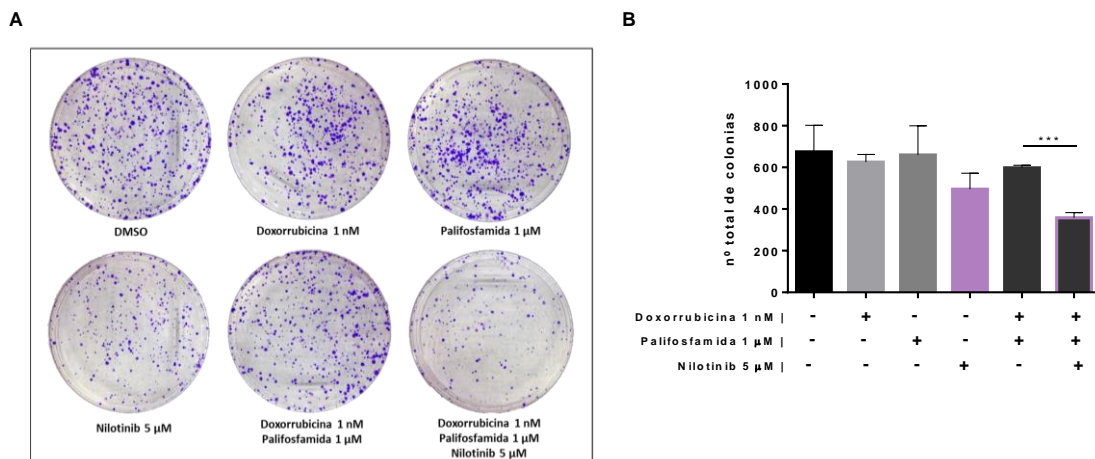
La viabilidad celular también fue menor cuando SK-UT-1 fue tratada con nilotinib 10 o 5  $\mu$ M y concentraciones bajas de doxorrubicina y palifosfamida ( $31,23 \pm 6,00$  % y  $44,14 \pm 16,34$  % con 10 y 5  $\mu$ M respectivamente), en comparación con la combinación doble a concentraciones más bajas: ( $56,19 \pm 10,35$  %);  $p=0,023$  (Figura 25C-D). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de viabilidad celular, comparando las combinaciones triples frente a la combinación doble, cuando las células SK-UT-1 se trataron con las concentraciones  $IC_{50}$  de doxorrubicina y palifosfamida (Figura 25A-B).

Además, los estudios clonogénicos, llevados a cabo en la línea celular SK-UT-1, mostraron que nilotinib 5  $\mu$ M ( $358,25 \pm 24,8$  colonias,  $p < 0,001$ ) (Figura 26) o avapritinib 5  $\mu$ M ( $35,33 \pm 33,49$  colonias,  $p=0,011$ ) (en combinación con doxorrubicina y

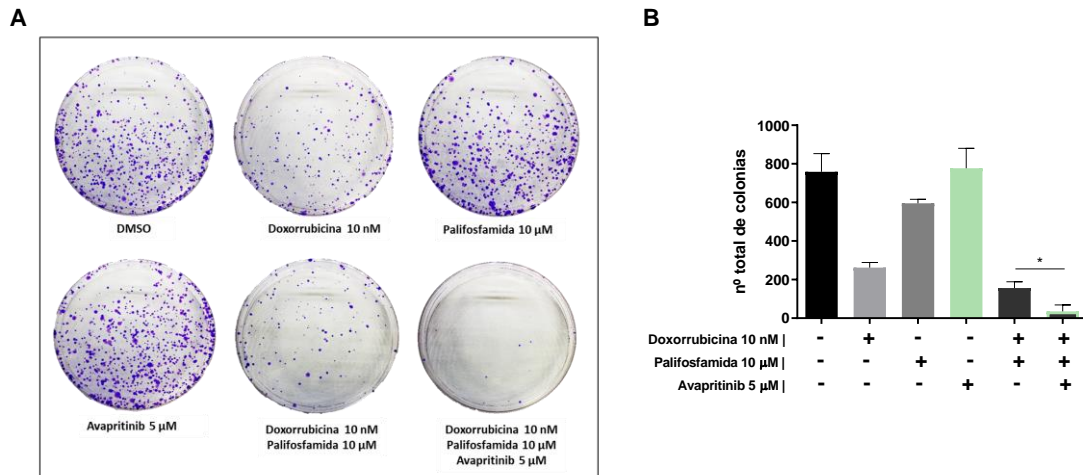
palifosfamida), redujo significativamente la formación de colonias en comparación con la combinación de doxorubicina y palifosfamida (Figura 27).



**Figura 25: Viabilidad celular en SK-UT-1 tras el tratamiento con doxorubicina, palifosfamida y nilotinib.** (A) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con nilotinib 10 μM y concentraciones IC<sub>50</sub> de doxorubicina (100 nM) y palifosfamida (20 μM). (B) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con nilotinib 5 μM y concentraciones IC<sub>50</sub> de doxorubicina (100 nM) y palifosfamida (20 μM). (C) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con nilotinib 10 μM y concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub> de doxorubicina (50 nM) y palifosfamida (10 μM). (D) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con nilotinib 5 μM y concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub> de doxorubicina (50 nM) y palifosfamida (10 μM). Los valores representados son el porcentaje de células viables ± DE en comparación con el tratamiento con DMSO. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar.

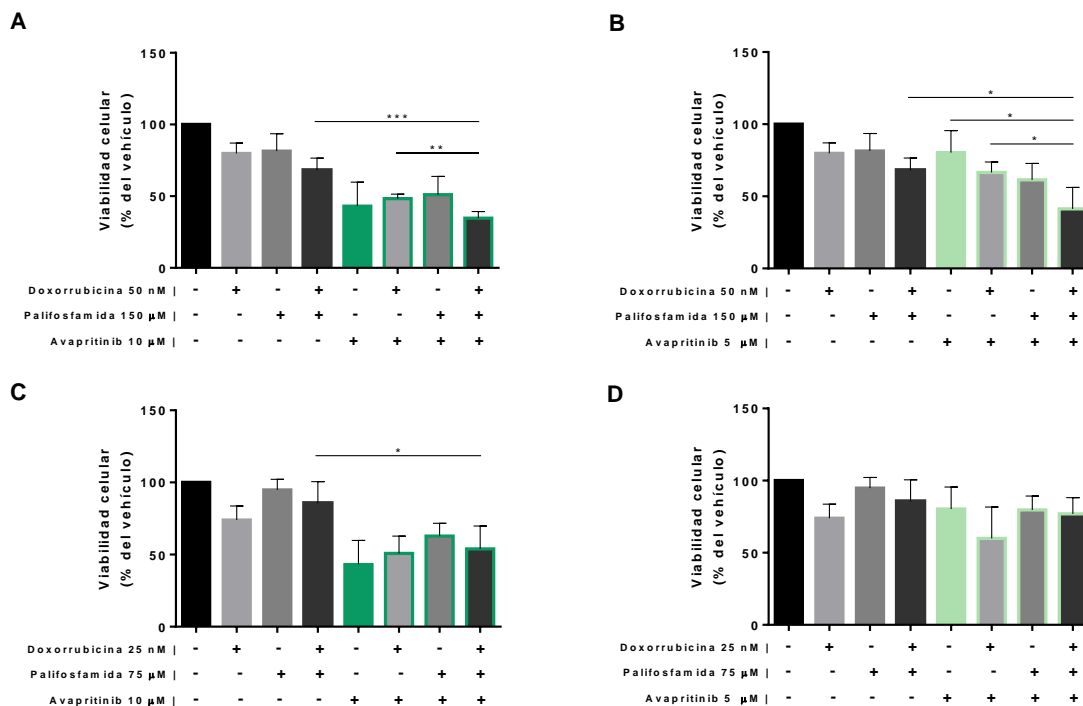


**Figura 26: Ensayo clonogénico en la línea celular SK-UT-1 tras tratamiento con la triple combinación de fármacos con nilotinib.** (A) Imagen de las colonias teñidas con cristal violeta tras el tratamiento con doxorubicina 10 nM y/o palifosfamida 10 μM y/o nilotinib 5 μM. (B) Gráfico representando el valor medio de colonias de tres experimentos diferentes (media del número total de colonias ± DE). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar.



**Figura 27: Ensayo clonogénico en la línea celular SK-UT-1 tras tratamiento con la triple combinación de fármacos con avapritinib.** (A) Imagen de las colonias teñidas con cristal violeta tras el tratamiento con doxorubicina 10 nM y/o palifosfamida 10 µM y/o avapritinib 5 µM. (B) Gráfico representando el valor medio de colonias de tres experimentos diferentes (media del número total de colonias  $\pm$  DE). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . DE: Desviación estándar.

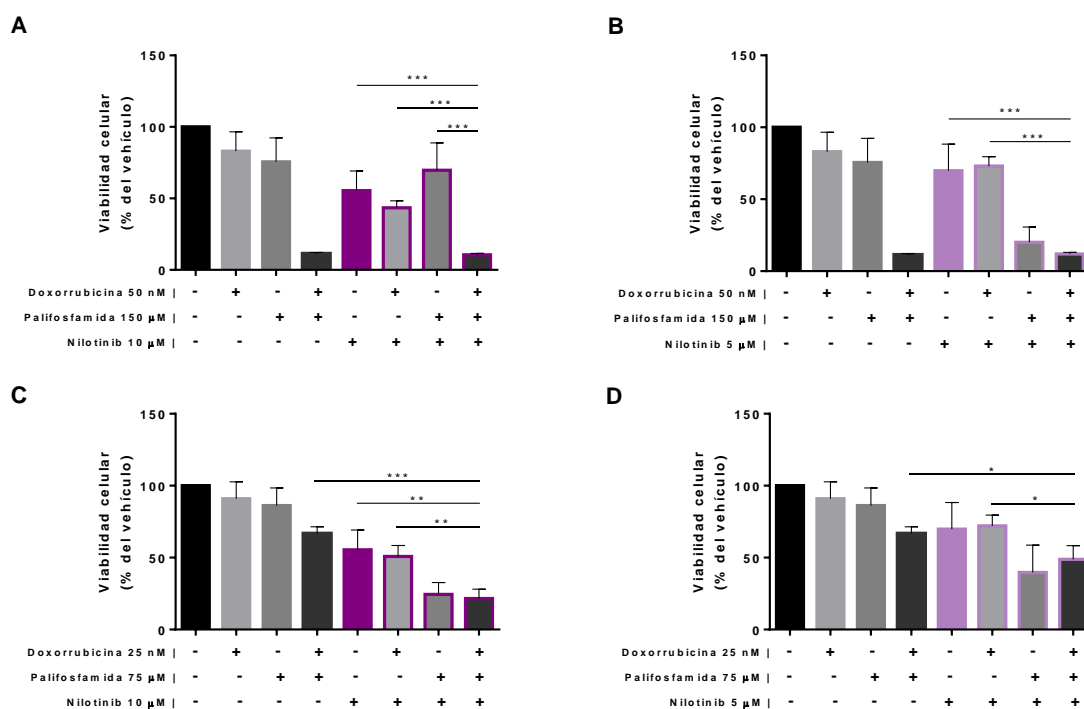
En la línea celular CP0024, la viabilidad celular disminuyó significativamente, cuando se comparó la combinación triple de avapritinib 10 µM y concentraciones de  $IC_{50}$  de doxorubicina y palifosfamida ( $34,71 \pm 2,28\%$ ) con la doble combinación de concentraciones de  $IC_{50}$  de doxorubicina y palifosfamida ( $68,12 \pm 4,33\%$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 28A). La viabilidad celular también fue menor cuando disminuimos la concentración de avapritinib a 5 µM para la combinación triple frente a la doble ( $41,33 \pm 7,44\%$ ;  $p = 0,020$ ) (Figura 28B). Se obtuvieron resultados similares cuando se trató la misma línea celular CP0024 con concentraciones más bajas de doxorubicina y palifosfamida y en combinación con avapritinib. En consecuencia, la viabilidad celular fue de  $53,96 \pm 7,93\%$  para la combinación triple con avapritinib 10 µM frente a  $85,56 \pm 7,51\%$  para la doble combinación,  $p = 0,030$  (Figura 28 C); mientras que no se encontraron diferencias significativas con concentraciones más bajas de doxorubicina más palifosfamida y 5 µM de avapritinib frente a la doble combinación a concentraciones más bajas (Figura 28D).



**Figura 28: Viabilidad celular en CP0024 tras el tratamiento con doxorrubicina, palifosfamida y avapritinib.** (A) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular CP0024 tratada con avapritinib 10 μM y concentraciones IC<sub>50</sub> de doxorrubicina (50 nM) y palifosfamida (150 μM). (B) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular CP0024 tratada con avapritinib 5 μM y concentraciones IC<sub>50</sub> de doxorrubicina (50 nM) y palifosfamida (150 μM). (C) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular CP0024 tratada con avapritinib 10 μM y concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub> de doxorrubicina (25 nM) y palifosfamida (75 μM). (D) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular CP0024 tratada con avapritinib 5 μM y concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub> de doxorrubicina (25 nM) y palifosfamida (75 μM). Los valores representados son el porcentaje de células viables ± DE en comparación con el tratamiento con DMSO. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar.

La viabilidad celular también fue menor cuando CP0024 fue tratada con nilotinib 10 μM y concentraciones bajas de doxorrubicina y palifosfamida ( $21,58 \pm 3,26$  %), en comparación con la combinación doble a concentraciones más bajas: ( $66,58 \pm 2,80$  %); p < 0,001 (Figura 29C). Así, la viabilidad disminuyó con la triple combinación de 5 μM y concentraciones bajas de doxorrubicina y palifosfamida frente a la doble ( $48,84 \pm 5,46$  %); p = 0,045 (Figura 29D). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de viabilidad celular, comparando las combinaciones triples

frente a la combinación doble, cuando las células CP0024 se trataron con las concentraciones  $IC_{50}$  de doxorubicina y palifosfamida (Figura 29A-B).



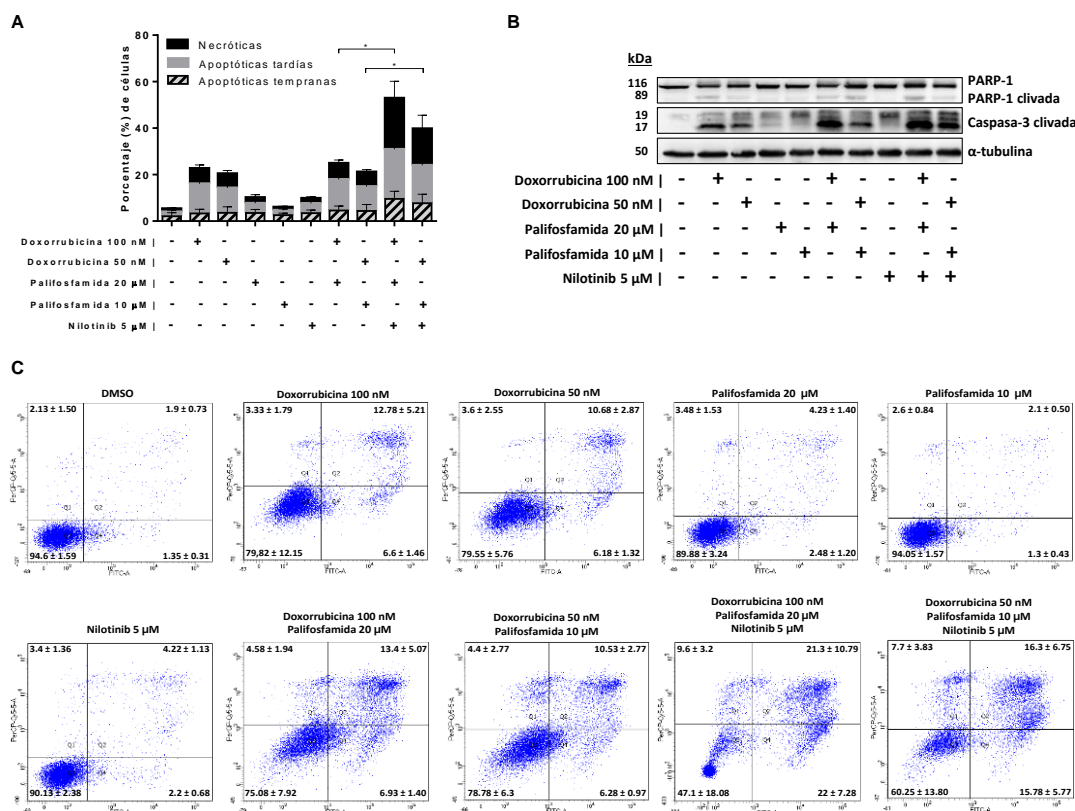
**Figura 29: Viabilidad celular en CP0024 tras el tratamiento con doxorubicina, palifosfamida y nilotinib.** (A) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular CP0024 tratada con nilotinib 10  $\mu$ M y concentraciones  $IC_{50}$  de doxorubicina (50 nM) y palifosfamida (150  $\mu$ M). (B) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular CP0024 tratada con nilotinib 5  $\mu$ M y concentraciones  $IC_{50}$  de doxorubicina (50 nM) y palifosfamida (150  $\mu$ M). (C) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con nilotinib 10  $\mu$ M y concentraciones *por debajo del*  $IC_{50}$  de doxorubicina (25 nM) y palifosfamida (75  $\mu$ M). (D) Viabilidad celular medida por ensayo MTS en la línea celular SK-UT-1 tratada con nilotinib 5  $\mu$ M y concentraciones *por debajo del*  $IC_{50}$  de doxorubicina (25 nM) y palifosfamida (75  $\mu$ M). Los valores representados son el porcentaje de células viables  $\pm$  DE en comparación con el tratamiento con DMSO. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . DE: Desviación estándar.

## 9. Estudio de la muerte celular tras la triple combinación de fármacos en líneas de SPB.

Para estudiar si la bajada en viabilidad se debía a un aumento en la muerte celular, decidimos estudiar la apoptosis celular tanto por citometría de flujo como por *Western-blot*. Los primeros indicios de apoptosis en las células se caracterizan por la traslocación del fosfolípido fosfatidilserina desde el interior al exterior de la membrana plasmática y así los sitios de unión de estos fosfolípidos quedan expuestos para la proteína de unión a fosfolípidos Anexina V. Tras ello, se pierde la integridad de la membrana plasmática, se fragmenta el ADN y se condensa la cromatina. La adición además de yoduro de propidio nos permite discriminar entre células vivas, células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas. El porcentaje de células apoptóticas/necróticas con cada uno de los tratamientos se evaluó en líneas celulares SK-UT-1 y CP0024, mediante

citometría de flujo, seleccionando avapritinib 5  $\mu\text{M}$  o nilotinib 5  $\mu\text{M}$  como concentraciones de trabajo para este ensayo. El tratamiento llevado a cabo fue de 48 h con doxorubicina y/o palifosfamida a concentraciones de  $\text{IC}_{50}$  o concentraciones bajas, con la adición del TKI correspondiente 24 h antes. La apoptosis celular se midió a las 72 h del inicio del tratamiento.

En SK-UT-1, el porcentaje de células apoptóticas/necróticas aumentó de  $24,9 \pm 7,94\%$  con doxorubicina y palifosfamida, en concentraciones  $\text{IC}_{50}$ , a  $52,9 \pm 18,08\%$  ( $p=0,037$ ) cuando las células se trataron con la triple combinación con 5  $\mu\text{M}$  de nilotinib, y de  $21,2 \pm 6,29\%$  a  $39,78 \pm 13,8\%$  ( $p=0,049$ ) al comparar doxorubicina más palifosfamida en concentraciones bajas con la combinación triple (Figura 30A,C). Así pues, se estudiaron marcadores de apoptosis a nivel de proteína por *Western-blot*, en concreto, la fragmentación o *clivado* de PARP-1 y de caspasa-3, efectores de la cascada

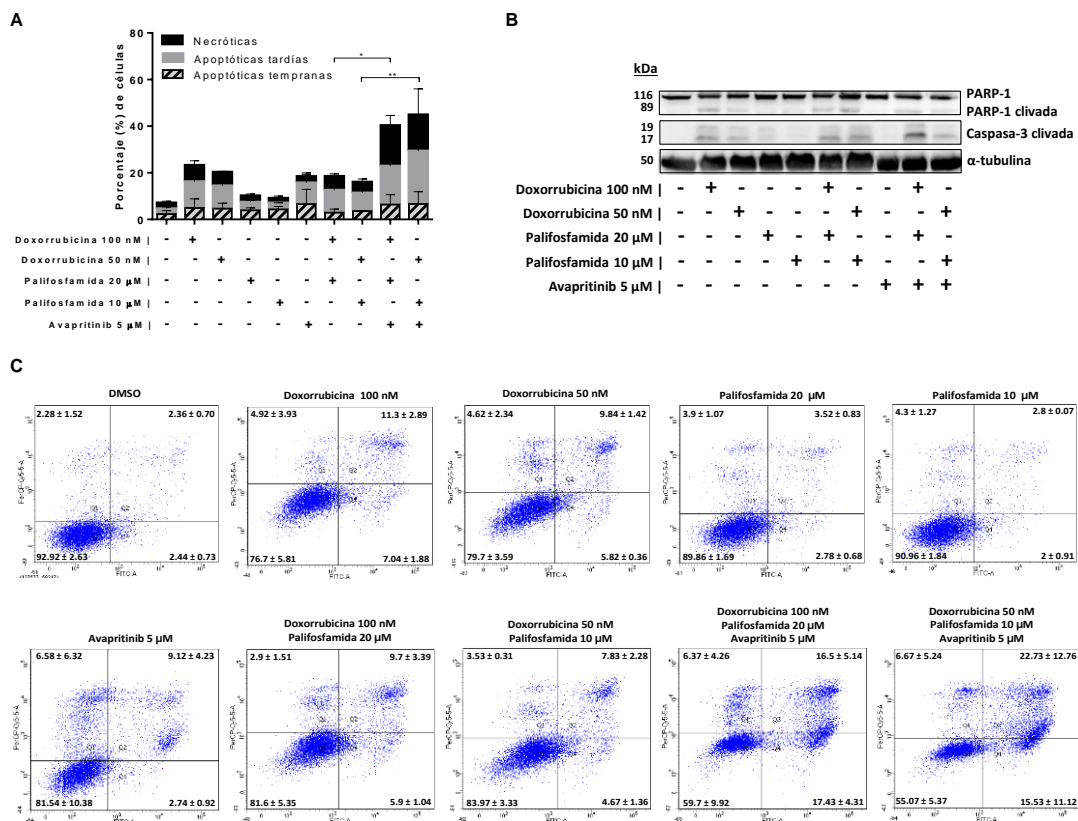


**Figura 30: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con nilotinib, doxorubicina y palifosfamida en SK-UT-1.** (A) Apoptosis en la línea celular SK-UT-1 después del tratamiento con nilotinib 5  $\mu\text{M}$  (24 horas antes) y/o concentraciones  $\text{IC}_{50}$  o concentraciones bajas de doxorubicina (100 nM/50 nM) y palifosfamida (20  $\mu\text{M}$ /10  $\mu\text{M}$ ). El porcentaje representado en el gráfico es la suma de células apoptóticas tempranas (células anexina positivas/yoduro de propidio negativas), células necróticas (células anexina negativas/yoduro de propidio positivas) y células apoptóticas (células anexina/yoduro de propidio positivas). Los valores representados son el porcentaje de células necróticas, apoptóticas tardías y apoptóticas tempranas  $\pm$  DE de cada condición. (B) Validación de la apoptosis por *Western-blot* utilizando los anticuerpos PARP-1, caspasa-3 y  $\alpha$ -tubulina, como control de carga. El tratamiento aplicado fue el mismo que en A. (C) Gráficos de puntos del estudio de la apoptosis celular mediante citometría de flujo. El eje X marca la anexina V y el eje Y el yoduro de propidio. En cada cuadrante se indica la media del porcentaje de células  $\pm$  DE. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . DE: Desviación estándar.



de apoptosis. Se observó un aumento significativo de los fragmentos de 19 y 17 kDa de caspasa-3 cuando se trataron las células con la triple combinación de fármacos tanto a concentraciones de IC<sub>50</sub> como a bajas concentraciones (Figura 30B). Además, se observó un leve aumento también del fragmento de 89 kDa de PARP-1 tras dicho tratamiento, apoyando estos resultados a los obtenidos con el marcaje AnexinaV-yoduro de propidio por citometría de flujo.

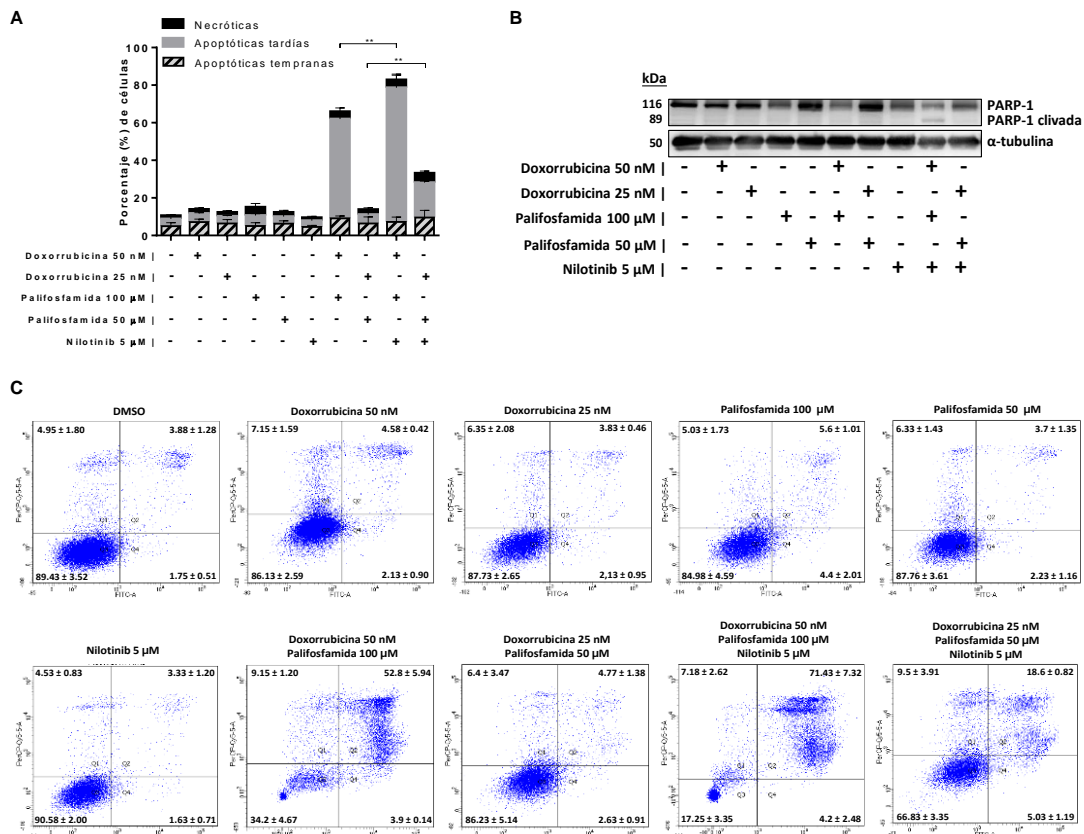
Cuando se utilizó avapritinib 5 μM en SK-UT-1 en combinación con concentraciones de IC<sub>50</sub> de doxorubicina y palifosfamida se observó un efecto similar, aumentando el porcentaje de células apoptóticas de 18,5 ± 5,35 % a 40,3 ± 9,9 2% (p=0,029) y también con estos dos últimos fármacos en concentraciones más bajas (de 16,03 ± 3,33 % a 44,93 ± 5,37 %, p=0,001) (Figura 31A,C). Esto se corroboró, de nuevo, a nivel de



**Figura 31: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con avapritinib, doxorubicina y palifosfamida en SK-UT-1.** (A) Apoptosis en la línea celular SK-UT-1 después del tratamiento con avapritinib 5 μM (24 horas antes) y/o concentraciones IC<sub>50</sub> o concentraciones bajas de doxorubicina (100 nM/50 nM) y palifosfamida (20 μM/10 μM). El porcentaje representado en el gráfico es la suma de células apoptóticas tempranas (células anexina positivas/yoduro de propidio negativas), células necróticas (células anexina negativas/yoduro de propidio positivas) y células apoptóticas (células anexina/yoduro de propidio positivas). Los valores representados son el porcentaje de células necróticas, apoptóticas tardías y apoptóticas tempranas ± DE de cada condición. (B) Validación de la apoptosis por *Western-blot* utilizando los anticuerpos PARP-1, caspasa-3 y α-tubulina, como control de carga. El tratamiento aplicado fue el mismo que en A. (C) Gráficos de puntos del estudio de la apoptosis celular mediante citometría de flujo. El eje X marca la anexina V y el eje Y el yoduro de propidio. En cada cuadrante se indica la media del porcentaje de células ± DE. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar.

proteína con la fragmentación de PARP-1 y caspasa-3, siendo más evidente esta última (Figura 31B).

En la línea celular CP0024 igualmente hubo un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células apoptóticas/necróticas, cuando se comparó la actividad de doxorubicina más palifosfamida con doxorubicina y palifosfamida más nilotinib. Esta diferencia se observó cuando las células se trataron con concentraciones de IC<sub>50</sub> de los fármacos (65,85 ± 4,6 % a 82,8 ± 3,34 %, p=0,006) o con concentraciones más bajas de doxorubicina y palifosfamida (13,8 ± 5,09 % a 33,13 ± 3,40 %, p=0,005) (Figura 32A,C). Asimismo, se observaron diferencias por *Western-blot* en los niveles de la proteína PARP-1, existiendo una disminución de la forma completa de la proteína en la doble combinación con doxorubicina y palifosfamida, que ocurre de igual manera en la triple combinación a concentraciones de IC<sub>50</sub> donde, además, observamos el

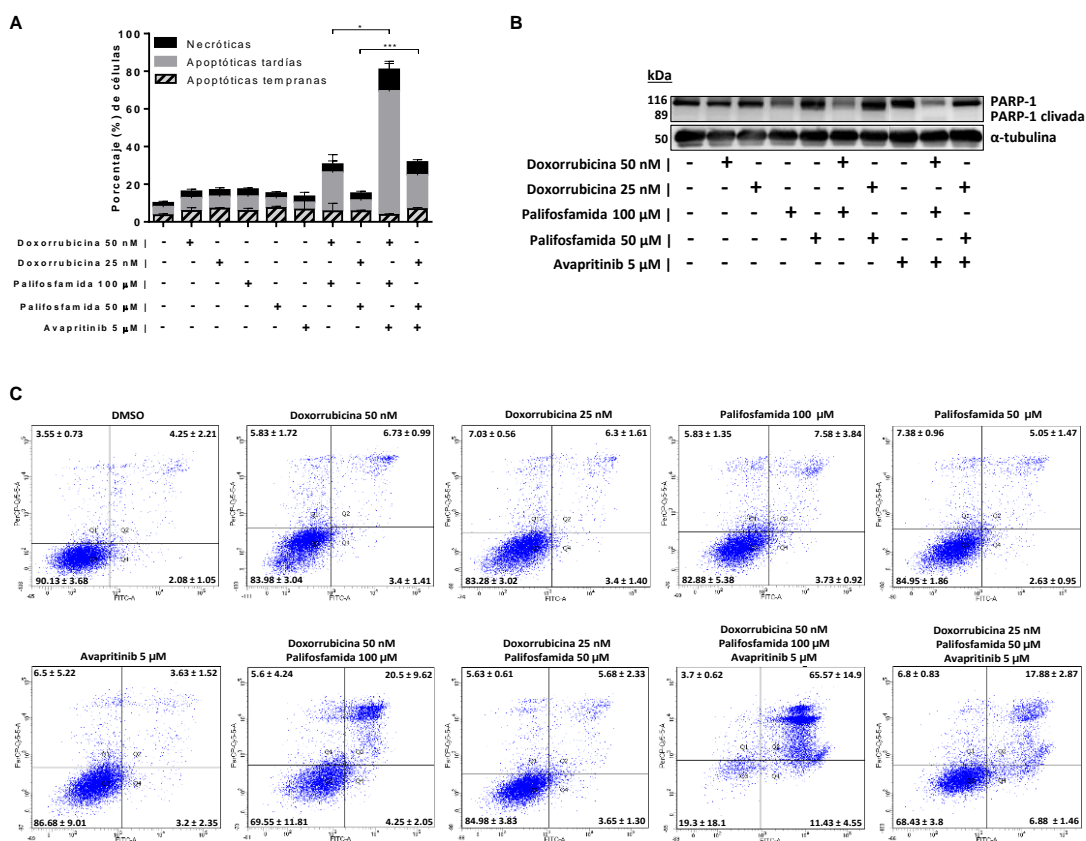


**Figura 32: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con nilotinib, doxorubicina y palifosfamida en CP0024.** (A) Apoptosis en la línea celular CP0024 después del tratamiento con nilotinib 5 μM (24 horas antes) y/o concentraciones IC<sub>50</sub> o concentraciones bajas de doxorubicina (50 nM/25 nM) y palifosfamida (100 μM/50 μM). El porcentaje representado en el gráfico es la suma de células apoptóticas tempranas (células anexina positivas/yoduro de propidio negativas), células necróticas (células anexina negativas/yoduro de propidio positivas) y células apoptóticas (células anexina/yoduro de propidio positivas). Los valores representados son el porcentaje de células necróticas, apoptóticas tardías y apoptóticas tempranas ± DE de cada condición. (B) Validación de la apoptosis por *Western-blot* utilizando el anticuerpo PARP-1 y α-tubulina, como control de carga. El tratamiento aplicado fue el mismo que en A. (C) Gráficos de puntos del estudio de la apoptosis celular mediante citometría de flujo. El eje X marca la anexina V y el eje Y el yoduro de propidio. En cada cuadrante se indica la media del porcentaje de células ± DE. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar.



fragmento de PARP-1 de 89 kDa, confirmando así la apoptosis que se observó por citometría de flujo (Figura 32B).

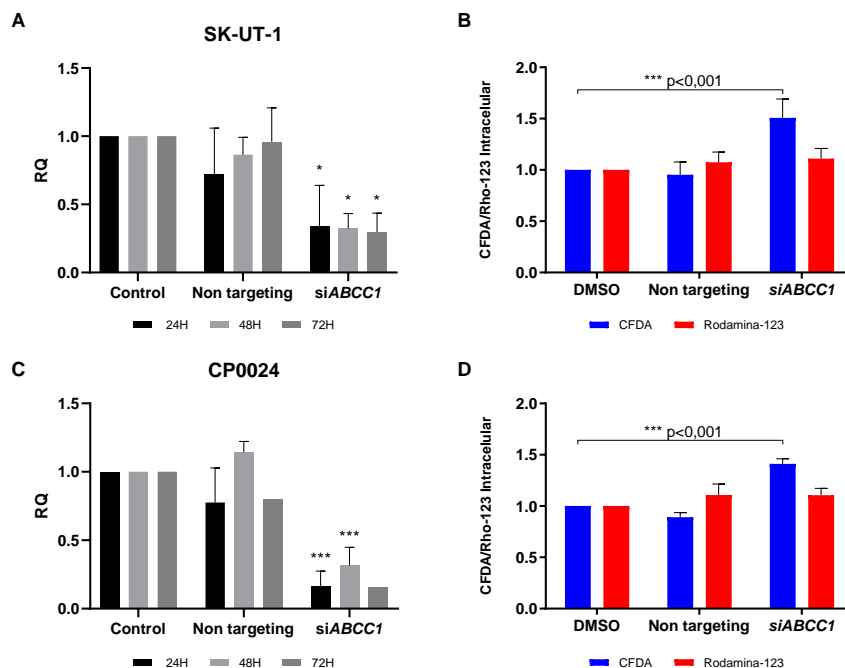
Cuando el TKI utilizado fue avapritinib en CP0024, la muerte celular aumentó de manera significativa de la combinación doble a concentraciones IC<sub>50</sub> a la combinación triple con avapritinib 5 μM (30,35 ± 11,81 % a 80,7 ± 18,1 % (p=0,042)) y también cuando se compararon el efecto de ambos fármacos a concentraciones más bajas frente a la triple combinación con avapritinib (14,95 ± 3,94 % a 31,55 ± 3,79 % (p<0,001)) (Figura 33A,C). Igualmente, los niveles de PARP-1 totales bajaron tanto en la doble combinación como en la triple a concentraciones de IC<sub>50</sub> de doxorubicina y palifosfamida, acompañándose en esta última de la fragmentación proteolítica de PARP-1 en su fragmento de 89 kDa (Figura 33B).



**Figura 33: Inducción de la muerte celular tras la triple combinación con avapritinib, doxorubicina y palifosfamida en CP0024.** (A) Apoptosis en la línea celular CP0024 después del tratamiento con avapritinib 5 μM (24 horas antes) y/o concentraciones IC<sub>50</sub> o concentraciones bajas de doxorubicina (50 nM/25 nM) y palifosfamida (100 μM/50 μM). El porcentaje representado en el gráfico es la suma de células apoptóticas tempranas (células anexina positivas/yoduro de propidio negativas), células necróticas (células anexina negativas/yoduro de propidio positivas) y células apoptóticas (células anexina/yoduro de propidio positivas). Los valores representados son el porcentaje de células necróticas, apoptóticas tardías y apoptóticas tempranas ± DE de cada condición. (B) Validación de la apoptosis por *Western-blot* utilizando el anticuerpo PARP-1 y α-tubulina, como control de carga. El tratamiento aplicado fue el mismo que en A. (C) Gráficos de puntos del estudio de la apoptosis celular mediante citometría de flujo. El eje X marca la anexina V y el eje Y el yoduro de propidio. En cada cuadrante se indica la media del porcentaje de células ± DE. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar.

### 10. Inhibición de *ABCC1* con un ARN corto de interferencia

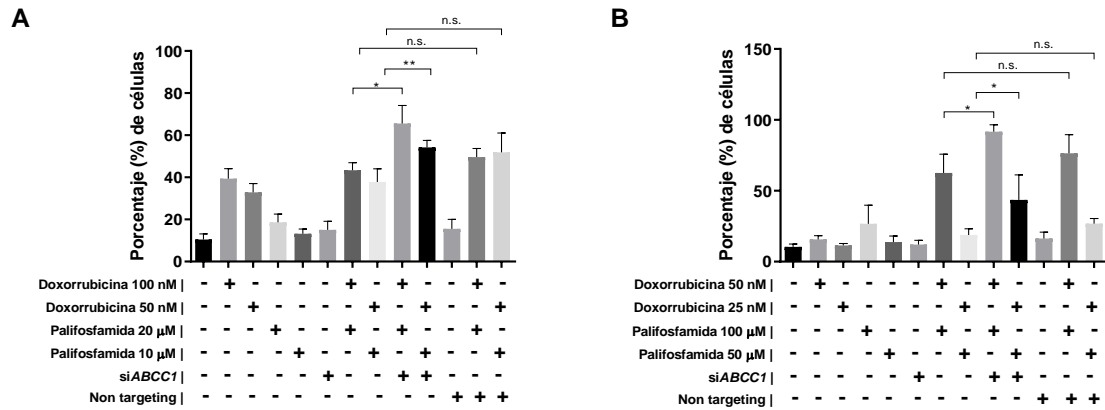
Por último, para comprobar que el efecto apoptótico y de inhibición del transporte a través MRP-1 se debe exclusivamente a la inhibición de dicho transportador, se procedió a la inhibición de *ABCC1* con un siARN. Se comprobó el silenciamiento en las líneas SK-UT-1 y CP0024, manteniéndose en niveles inferiores al 50% de expresión a las 24, 48 y 72 h post-silenciamiento (Figura 34A,C). A las 24 h del silenciamiento, se comprobó si la bajada de los niveles de *ABCC1* producían un incremento del CFDA intracelular, sustrato específico de MRP-1, y en ambas líneas se produjo una acumulación mayor con respecto al control con DMSO ( $1,51 \pm 0,18$  veces ( $p=0,001$ ) en SK-UT-1 y  $1,41 \pm 0,05$  veces ( $p<0,001$ ) en CP0024) (Figura 34B,D).



**Figura 34: Efecto inhibitorio del siARN de *ABCC1* en la actividad de eflujo de MRP-1 y P-gp en las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024.** (A) Cuantificación relativa frente al control de la expresión génica de *ABCC1* a las 24, 48 y 72 horas tras la transfección con siARN en la línea SK-UT-1. Las células fueron no tratadas, tratadas con 15 nM de siARN *non targeting pool* o con 15 nM de siARN de *ABCC1* (media  $\pm$  DE) (B) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular SK-UT-1. Las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO), 15 nM de siARN *non targeting* y 15 nM de siARN de *ABCC1* (media  $\pm$  DE) (C) Cuantificación relativa frente al control de la expresión génica de *ABCC1* a las 24, 48 y 72 horas tras la transfección con siARN en la línea CP0024. Las células fueron tratadas igual que en A (media  $\pm$  DE). (D) Fluorescencia intracelular de CFDA/Rho-123 en la línea celular CP0024. Las células fueron tratadas igual que en B (media  $\pm$  DE). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . DE: Desviación estándar.

Asimismo, la combinación de un siARN con doxorrubicina y palifosfamida resultó en un incremento de la apoptosis celular, tanto a concentraciones de  $IC_{50}$  ( $65,57 \pm 4,94$  vs  $43,40 \pm 2,50$  ( $p=0,045$ )) o a bajas concentraciones ( $54,17 \pm 1,94$  vs  $37,75 \pm 3,15$  ( $p=0,001$ )) en comparación con la doble combinación de doxorrubicina y palifosfamida en la línea celular SK-UT-1 (Figura 35A). Lo mismo ocurrió en la línea celular CP0024:

91,73 ± 2,82 vs 62,60 ± 9,30 (p=0,034) a concentraciones de IC<sub>50</sub> de doxorubicina y palifosfamida más siARN frente a la doble combinación, y 46,60 ± 10,15 vs 18,83 ± 2,17 (p=0,038) a bajas concentraciones de ambos quimioterápicos más siARN de *ABCC1* frente a la doble combinación (Figura 35B).



**Figura 35: Inducción de la muerte celular por la triple combinación de doxorubicina, palifosfamida y el siARN contra *ABCC1* en SK-UT-1 y CP0024.** El porcentaje representado en el gráfico es la suma de células apoptóticas tempranas (células anexina positivas/yoduro de propidio negativas), células necróticas (células anexina negativas/yoduro de propidio positivas) y células apoptóticas (células anexina/yoduro de propidio positivas). Los valores representados son la media del porcentaje de células necróticas, apoptóticas tardías y apoptóticas tempranas de 3 experimentos diferentes ± DE. (A) Apoptosis en la línea celular SK-UT-1 tras el tratamiento con 15 nM de siABCC1 o siNonTargeting (24 horas antes) y/o concentraciones IC<sub>50</sub> o concentraciones bajas de doxorubicina (100 nM/50 nM) y palifosfamida (20 µM/10 µM) (B) Apoptosis en la línea celular CP0024 tras el tratamiento con 15 nM de siABCC1 o siNonTargeting (24 horas antes) y/o concentraciones IC<sub>50</sub> o concentraciones bajas de doxorubicina (50 nM/25 nM) y palifosfamida (100 µM/50 µM). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t de Student para datos no apareados y se consideraron significativas cuando p < 0,05. DE: Desviación estándar ± DE.

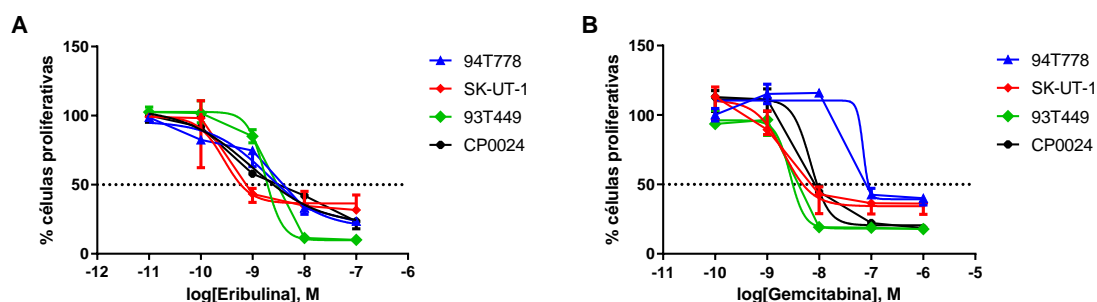


## Capítulo II: Estudio de la combinación de eribulina y gemcitabina en L-sarcomas: abordaje *in vitro* e *in vivo*.

### 1. Estudios *in vitro*

#### 1.1. Estudio del mejor esquema de combinación de eribulina y gemcitabina

Para el estudio *in vitro* de la combinación de eribulina y gemcitabina en L-sarcomas, se utilizaron cuatro líneas tumorales humanas: dos de LMS, CP0024 (cultivo primario) y SK-UT-1 y dos de LPS, 93T449 y 94T778. En primer lugar, se identificó la concentración de fármaco óptima para cada compuesto calculando la concentración mínima inhibitoria (IC<sub>50</sub>) en cada línea celular. Se midió la viabilidad celular por MTS a las 72h de la adición de fármacos y todas las líneas mostraron valores de IC<sub>50</sub> en el rango de nanomolar para ambos fármacos (Figura 36; Tabla 15). Nuestros resultados indicaron que las líneas celulares de LMS eran más sensibles a eribulina que las líneas celulares de LPS, estando el IC<sub>50</sub> ambas líneas de LMS por debajo de 1 nM.



**Figura 36: Viabilidad celular tras el tratamiento con eribulina o gemcitabina en líneas celulares de L-sarcomas.** (A) Viabilidad celular medida a las 72 horas por MTS tras el tratamiento con eribulina a concentraciones en el rango de 10<sup>-11</sup> a 10<sup>-7</sup> molar en 94T778, SK-UT-1, 93T449 y CP0024. (B) Viabilidad celular medida a las 72 horas por MTS tras el tratamiento con gemcitabina a concentraciones en el rango de 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-6</sup> molar en 94T778, SK-UT-1, 93T449 y CP0024. Las gráficas muestran la media de 3 repeticiones independientes realizadas en triplicado.

**Tabla 15: IC<sub>50</sub> para eribulina y gemcitabina, expresado en nM, en líneas celulares de L-sarcomas.**

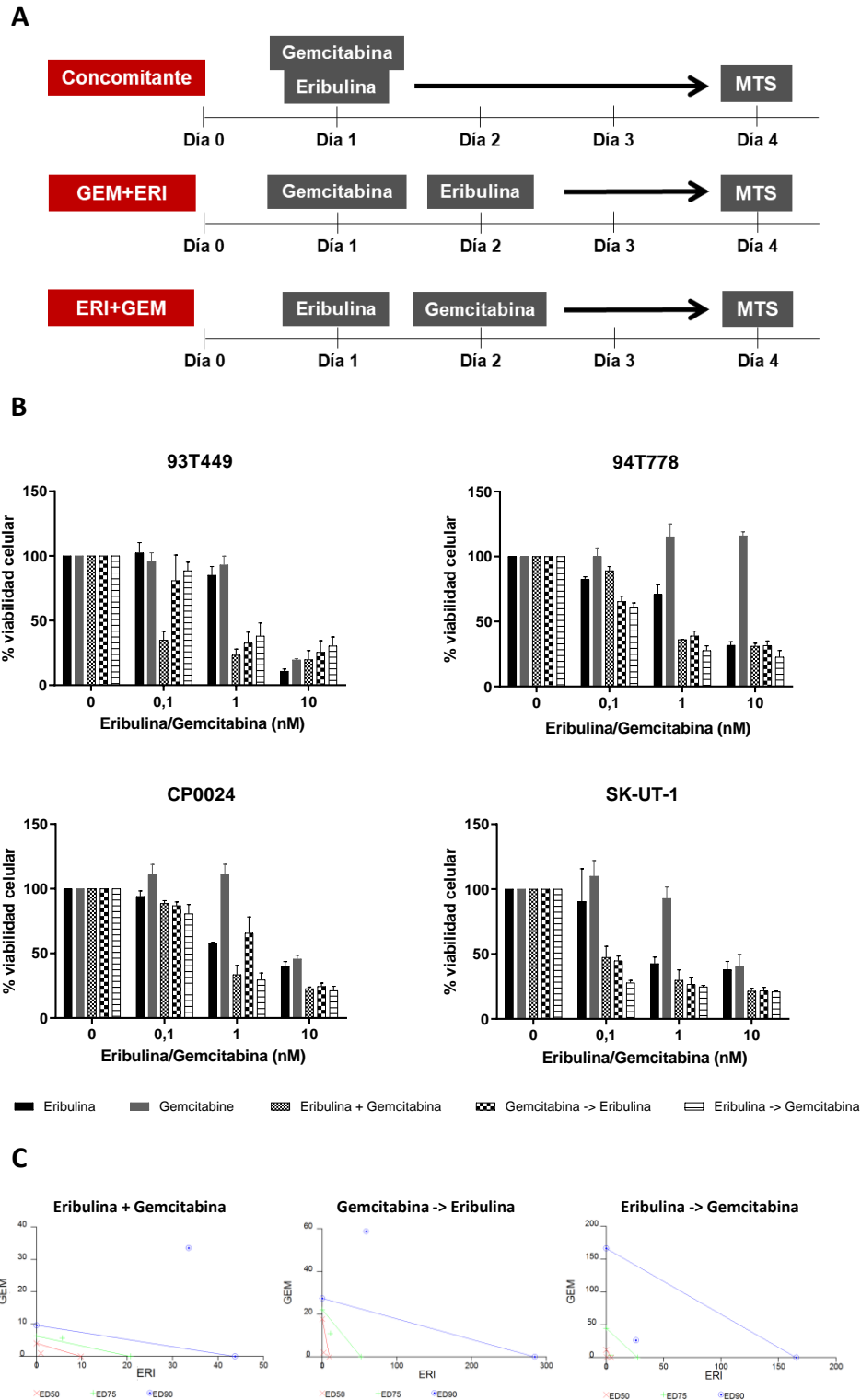
	Eribulina	Gemcitabina
93T449	1,75	2,76
94T778	1,98	7,02
CP0024	0,95	6,81
SK-UT-1	0,28	2,10

A continuación, se testó si el efecto citotóxico de la eribulina podría verse potenciado por la combinación con gemcitabina y si existía una sinergia entre ambos fármacos probando tres combinaciones diferentes: adición simultánea de ambos fármacos, adición secuencial de eribulina seguida de gemcitabina y adición secuencial de gemcitabina seguida de eribulina. El segundo fármaco se añadió 24h después del primer fármaco y en todos los casos, la viabilidad celular fue evaluada por MTS a las 72h del primer tratamiento farmacológico (Figura 37A). Se observaron caídas en la viabilidad

celular que van desde  $90,00 \pm 25,17 \%$  a  $27,78 \pm 2,52 \%$  en la línea celular SK-UT-1 al comparar la monoterapia con eribulina y eribulina en diferentes combinaciones de gemcitabina (Figura 37B). Esto fue especialmente evidente a concentraciones bajas de ambos fármacos (0,1 y 1 nM) en las líneas celulares. Al estudiar el  $IC_{50}$  de las combinaciones se observó que, para ambas líneas celulares de LMS, el esquema de eribulina añadida previamente a la gemcitabina es la combinación más efectiva, con  $IC_{50}$  por debajo de 0,02 (0,199 para la línea celular CP0024 y  $6,272 \times 10^{-6}$  para SK-UT-1) (Figura 37B, Tabla 16). El análisis estadístico y los isobogramas demostraron que existe un efecto sinérgico citotóxico cuando ambos fármacos se combinaron, siendo más efectiva la adición de eribulina previa a la gemcitabina, que fue la combinación elegida para continuar con los subsiguientes estudios (Figura 37C, Tabla S3).

**Tabla 16:  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  y  $IC_{90}$  en las líneas celulares CP0024, SK-UT-1, 94T778 y 93T449 tras las diferentes secuencias de tratamiento. ERI: eribulina; GEM: gemcitabina.**

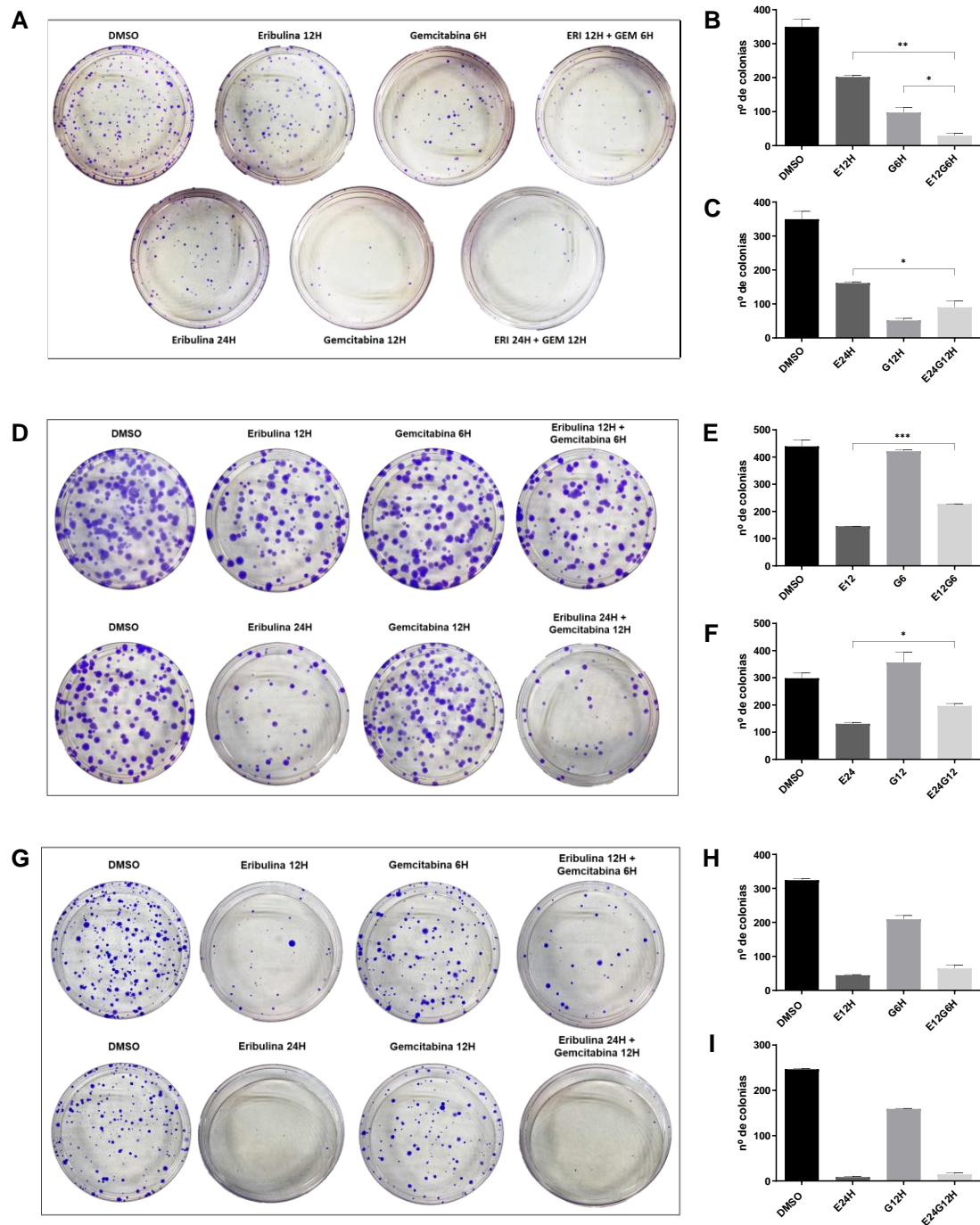
	$IC_{50}$	$IC_{75}$	$IC_{90}$
<b>CP0024</b>			
Concomitante	0,336	1,184	4,250
GEM -> ERI	0,334	0,711	2,351
ERI -> GEM	0,199	0,244	0,316
<b>SK-UT-1</b>			
Concomitante	0,272	1,339	6,605
GEM -> ERI	0,023	0,337	9,236
ERI -> GEM	$6,272e^{-006}$	0,138	18128
<b>94T778</b>			
Concomitante	0,894	0,700	0,761
GEM -> ERI	0,218	6,397	187,910
ERI -> GEM	0,168	0,579	2,001
<b>93T449</b>			
Concomitante	0,374	1,286	4,425
GEM -> ERI	0,377	0,6413	1,091
ERI -> GEM	0,628	0,671	0,800



**Figura 37: Viabilidad tras los diferentes esquemas de combinación de eribulina y gemcitabina en líneas de L-sarcomas.** (A) Esquemas representativos de las diferentes combinaciones farmacológicas testadas en las líneas celulares. Las células fueron sembradas a día cero y tratadas en el día 1 y/o 2. La viabilidad se midió en el día 4 por MTS. (B) Viabilidad celular en las líneas de LPS (gráficas superiores) y LMS (gráficas inferiores). Se testaron las siguientes condiciones: eribulina en monoterapia, gemcitabina en monoterapia, eribulina más gemcitabina, gemcitabina pre-eribulina y eribulina pre-gemcitabina, todas ellas a concentraciones, 0,1, 1 y 10 nM de ambos fármacos. Las gráficas muestran la media de 3 repeticiones independientes realizadas en triplicado (media  $\pm$  DE). (C) Isobogramas de la línea celular SK-UT-1 donde se representan la IC<sub>50</sub> (rojo), IC<sub>75</sub> (verde) e IC<sub>90</sub> (azul) para cada una de las combinaciones testadas. DE: Desviación estándar; ERI: eribulina, GEM: gemcitabina, MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphonyl)-2H-tetrazolium, inner salt.

Otra manera de estudiar la viabilidad es el ensayo de clonogenicidad que es la capacidad de una célula para crear una colonia después del tratamiento, en este caso, con eribulina y/o gemcitabina. En la línea celular 93T449, se observó que cuando las células fueron tratadas con la combinación tanto a las 12 h de eribulina más 6 h de gemcitabina (Figura 38B) o 24 h de eribulina más 12 h de gemcitabina (Figura 38C), la capacidad del cultivo para formar clones es menor, siendo la diferencia con la monoterapia con eribulina estadísticamente significativa ( $p=0,002$  y  $p=0,033$  para 12-6 y 24-12 horas de combinación respectivamente) (Figura 38A-C). En el caso de las líneas celulares de LMS, observamos una tendencia, en la línea celular SK-UT-1 tanto a las 24 como a las 12 h, que hace que la monoterapia tenga una menor capacidad clonogénica que la combinación (Figura 38G-I). El mismo efecto se observa en la línea celular CP0024, siendo esta diferencia significativa ( $p<0,001$  y  $p=0,012$  para 12 y 24 h de tratamiento respectivamente) (Figura 38D-E).



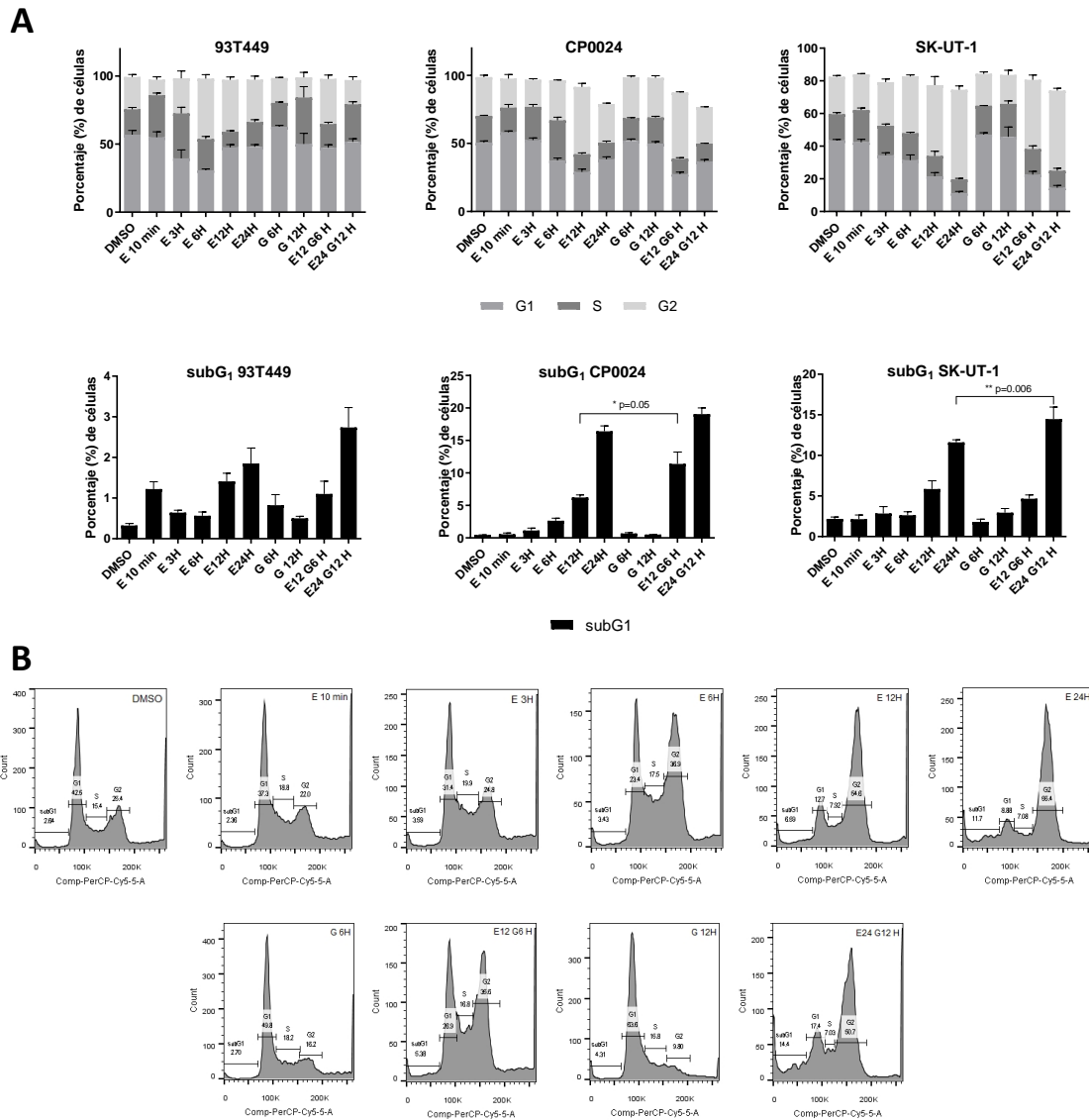


**Figura 38: Ensayo clonogénico tras la combinación con eribulina y gemcitabina en líneas de L-sarcomas.** Los esquemas de tratamiento en las tres líneas fueron de 12 horas de eribulina con la adición de gemcitabina a las 6 horas de tratamiento o 24 horas de tratamiento con eribulina con la adición de gemcitabina a las 12 horas. (A) Imágenes del ensayo de clonogenicidad en la línea 93T449 tras el tratamiento con eribulina (10 nM) y/o gemcitabina (30 nM). (B) Número de colonias en la línea 93T449 tras la combinación 12 horas de ERI más 6 de GEM. (C) Número de colonias en la línea 93T449 tras la combinación 24 horas de ERI más 12 de GEM (D) Imágenes del ensayo de clonogenicidad en la línea CP0024 tras el tratamiento con eribulina (1 nM) y/o gemcitabina (3 nM). (E) Número de colonias en la línea CP0024 tras la combinación 12 horas de ERI más 6 de GEM. (F) Número de colonias en la línea CP0024 tras la combinación 24 horas de ERI más 12 de GEM. (G) Imágenes del ensayo de clonogenicidad en la línea SK-UT-1 tras el tratamiento con eribulina (1 nM) y/o gemcitabina (3 nM). (H) Número de colonias en la línea SK-UT-1 tras la combinación 12 horas de ERI más 6 de GEM (I) Número de colonias en la línea SK-UT-1 tras la combinación 24 horas de ERI más 12 de GEM. La gráfica muestra la media de 3 repeticiones independientes y la SEM (desviación estándar de la media). Test t de Student para datos no pareados: \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005. E/ERI: Eribulina; G/GEM: Gemcitabina.

## 1.2. Estudio del ciclo celular y la apoptosis tras la combinación de eribulina y gemcitabina.

Con el fin de comprender los mecanismos moleculares responsables de la sinergia observada en los experimentos de viabilidad celular tras la secuencia de eribulina seguida de gemcitabina, decidimos comprobar si la reducción en la viabilidad celular podría ser una consecuencia de un aumento de los eventos apoptóticos. Puesto que hasta ahora todos los experimentos han revelado resultados similares en las cuatro líneas celulares testadas y nuestro interés se centra en LMS debido a que eribulina no está aprobada para dicho subtipo histológico, decidimos realizar el subsecuente análisis solamente en una línea celular de LPS (93T449) y en dos líneas de LMS (CP0024 y SK-UT-1). Utilizando citometría de flujo para analizar el contenido de ADN celular, cuantificamos los eventos hipodiploides de la población subG1, que mide la fragmentación del ADN que ocurre durante la apoptosis y la muerte celular. Tras una cinética de 24 h con eribulina, observamos un ligero aumento de la población subG1 en las líneas celulares 93T449, CP0024 y SK-UT-1 conforme fueron pasando las horas de tratamiento (Figura 39A). Al igual que en los experimentos de viabilidad celular, nuevamente se observó que las líneas celulares de LMS fueron más sensibles a la eribulina mostrando niveles más altos de células en subG1 ( $17,45 \pm 0,68$  % de las células tras 24 h de tratamiento en CP0024 y  $11,6 \pm 2,25$  % en la línea celular SK-UT-1) en comparación con la línea celular de LPS 93T449 ( $1,85 \pm 0,21$  % después de 24 h de tratamiento) (Figura 39A). Además, la concentración de eribulina utilizada en CP0024 y SK-UT-1 fue menor en comparación con la utilizada en 93T449 (1 nM vs 10 nM).

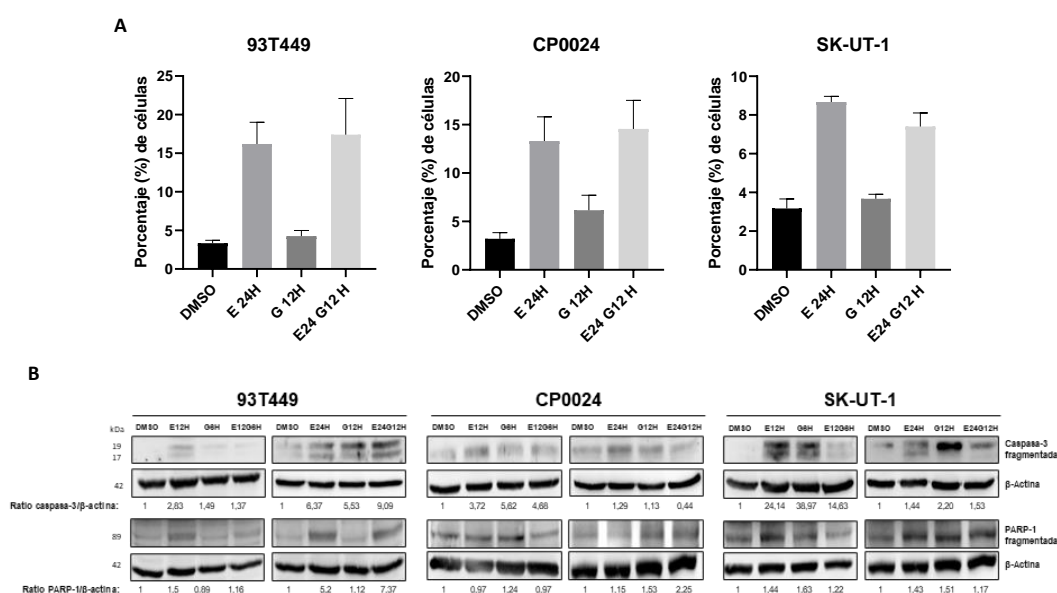
Cuando se trataron las células con eribulina seguida de gemcitabina (con un intervalo de diferencia de 6 o 12 h, es decir, 12 h de tratamiento de eribulina y se añade gemcitabina a mitad de dicho periodo (E12hG6h) o 24 horas de eribulina y se añade gemcitabina a la mitad del periodo (E24hG12h)), observamos un ligero aumento en el número de células subG1, siendo esta diferencia significativa en las dos líneas celulares de LMS y no en la de LPS con respecto a eribulina en monoterapia ( $2,74 \pm 0,49$ -E24hG12h vs  $1,85 \pm 0,38$ -E24h en 93T449;  $6,21 \pm 0,4$ -E12hG6h vs  $11,39 \pm 1,82$ -E12h en CP0024;  $15,87 \pm 0,74$ -E24hG12h vs  $11,6 \pm 0,32$ -E24h en SK-UT-1) (Figura 39A). Curiosamente, al observar el perfil del ciclo celular, los tiempos cortos de incubación de eribulina (de 10 min a 3h) llevaron a un retraso en la progresión de la fase S, mientras que los tiempos de incubación más largos (de 6 a 24h) llevaron a una parada del ciclo en G2 (Figura 39A). La detención en G2 parece ser reversible ya que el porcentaje de células G2 disminuyó de 12 a 24h, excepto en la línea celular SK-UT-1. En cambio, con gemcitabina, observamos una parada del ciclo en G1 tanto a 6 como a 12 h de tratamiento (Figura 39A-B).



**Figura 39: Estudio de la alteración del ciclo celular tras el tratamiento con eribulina y gemcitabina.** (A) Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. En los gráficos superiores se muestran las células en fase G1, S y G2 de las líneas celulares 93T449, CP0024 y SK-UT-1. 93T449 se trató con 10 nM de eribulina y 30 nM de gemcitabina y SK-UT-1 con 1 nM de eribulina y 3 nM de gemcitabina (media  $\pm$  SEM). En los gráficos inferiores se muestra el porcentaje de células en subG1 (media  $\pm$  SEM). (B) Ejemplo de perfiles de ciclo celular en la línea SK-UT-1 tras el tratamiento con eribulina (1 nM) y gemcitabina (3 nM). De izquierda a derecha fila superior: DMSO, eribulina 10 min, 3, 6, 12 y 24 horas; fila inferior: gemcitabina 6 horas, eribulina 12 horas + gemcitabina 6 horas, gemcitabina 12 horas y eribulina 24 horas + gemcitabina 12 horas. La gráfica muestra la media de 3 repeticiones independientes. Test t de Student para datos no pareados: \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005. SEM: Desviación estándar de la media.

Las células que entran en apoptosis en las fases S o G2/M pueden no aparecer en la población subG1 en análisis de FACS. Teniendo en cuenta el retraso de fase S y la parada en G2/M observada tras el tratamiento con eribulina en las líneas de L-sarcomas, decidimos medir directamente las células apoptóticas por citometría de flujo marcándolas con anexina V y yoduro de propidio. Las líneas celulares mostraron un claro aumento de los eventos apoptóticos después del tratamiento con eribulina durante 24 h. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la monoterapia y el

tratamiento en combinación con gemcitabina durante 12 h (Figura 40A). También confirmamos estos resultados estudiando marcadores apoptóticos por *Western-blot* tal como la fragmentación de PARP-1 y de caspasa 3. Se observó un aumento significativo del fragmento de 89 kDa de PARP-1 y de los fragmentos de 17 y 19 kDa de caspasa 3 tras 24 h de tratamiento con eribulina en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, la combinación con gemcitabina no aumentó los niveles de estas dos proteínas en comparación con la eribulina en monoterapia en las tres líneas celulares del estudio (Figura 40B).

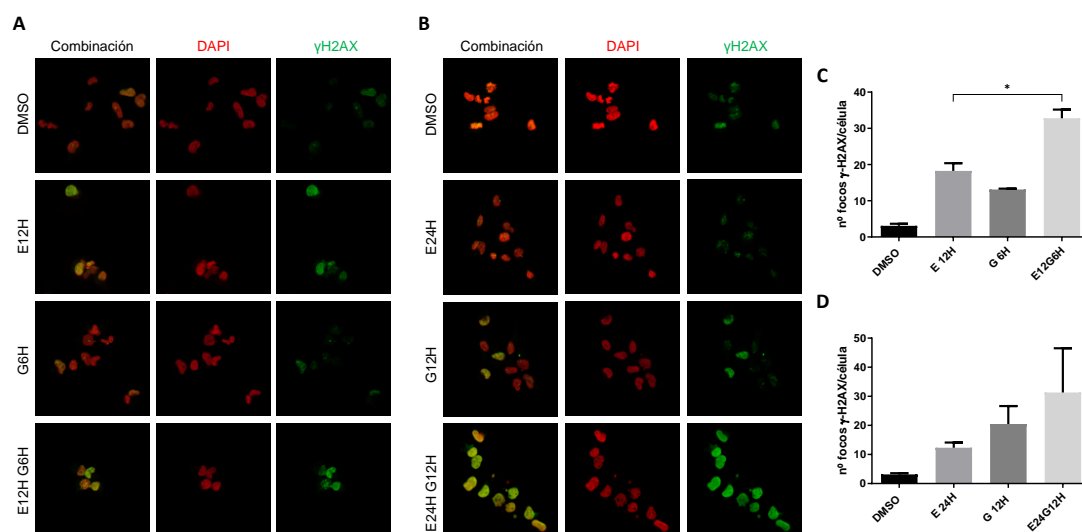


**Figura 40: Estudio de la apoptosis celular tras la combinación de eribulina y gemcitabina en líneas de L-sarcomas.** (A) Apoptosis celular medida por citometría de flujo tras la exposición a 10 nM de eribulina y 30 nM de gemcitabina en 93T449 y 1 nM de eribulina y 3 nM de gemcitabina en CP0024 y SK-UT-1. Se trató con eribulina 24 horas y/o gemcitabina 12 horas y las gráficas representan las células apoptóticas tanto tempranas como tardías (media  $\pm$  SEM). Las gráficas muestran la media de 3 repeticiones independientes. (B) *Western-blot* de los marcadores apoptóticos caspasa 3 fragmentada y PARP-1 fragmentada, utilizando anticuerpos frente a ellos y  $\beta$ -actina como control de carga. Las concentraciones de fármacos fueron las mismas que en A y los tiempos de tratamiento fueron 12 horas de eribulina y/o 6 de gemcitabina y 24 horas de eribulina y/o 12 de gemcitabina. SEM: Desviación estándar de la media.

### 1.3. Estudio del daño al ADN tras el tratamiento combinado de eribulina y gemcitabina.

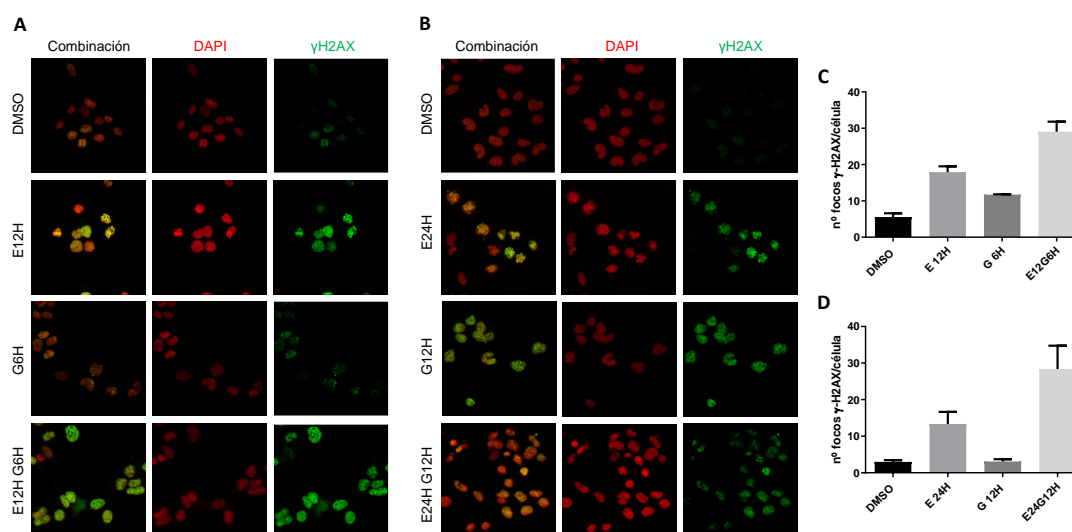
Con el fin de evaluar los mecanismos implicados en el efecto sinérgico de la combinación de eribulina seguida de gemcitabina, se estudió la acumulación de daño en el ADN, utilizando el marcador subrogado  $\gamma$ -H2AX, que nos informa de la acumulación de daño en forma de roturas de doble cadena en el ADN de las células. Se siguió dos esquemas de tratamiento: el primero de ellos donde las células fueron tratadas con 12 h de eribulina (10 nM en el caso de 93T449 y 1 nM para CP0024 y SK-UT-1), 6 h de gemcitabina (30 nM en 93T449 y 3 nM en CP0024 y SK-UT-1) o la combinación de ambos (12 h de eribulina con la adición de gemcitabina a las 6 h de

tratamiento con eribulina). En el segundo esquema de tratamiento se trataron las células durante 24 h con eribulina (10 nM para 93T449 y 1 nM para CP0024 y SK-UT-1), 12 h con gemcitabina (30 nM en 93T449 y 3 nM en CP0024 y SK-UT-1) o la combinación de ambos (24 h de eribulina con la adición de gemcitabina a las 12 h de tratamiento con eribulina). Estudiamos la formación de los focos de  $\gamma$ -H2AX y los niveles de dicha proteína por *Western-blot*. Curiosamente, tanto en las líneas celulares de LPS y LMS, observamos una acumulación de focos de  $\gamma$ -H2AX tras el tratamiento en monoterapia con eribulina o la combinación tanto a las 24 como a las 12 h con eribulina. En la línea celular de LPS 93T449, la acumulación de focos es mayor con la combinación que con eribulina en monoterapia, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a las 12 h de tratamiento ( $32,78 \pm 2,40$  vs.  $18,24 \pm 2,14$ ;  $p=0,046$ ) (Figura 41). La misma diferencia se observó a nivel de proteína, especialmente tras la secuencia de tratamiento de 24 h de eribulina – 12 h de gemcitabina (Figura 44).



**Figura 41: Estudio del daño al ADN tras la combinación de eribulina y gemcitabina en la línea celular 93T449.** (A) Inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ -H2AX tras el tratamiento de 12 horas con eribulina (10 nM) y/o 6 horas con gemcitabina (30 nM). Las células se tiñeron con el colorante DAPI (control nuclear, rojo) y con el anticuerpo contra  $\gamma$ -H2AX (verde). (B) Inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ -H2AX tras el tratamiento de 24 horas con eribulina (10 nM) y/o 12 horas con gemcitabina (30 nM). Las células se tiñeron con el colorante DAPI (control nuclear, rojo) y con el anticuerpo contra  $\gamma$ -H2AX (verde). (C) Cuantificación del número de focos por célula tras el mismo tratamiento que en A. (D) Cuantificación del número de focos por célula tras el mismo tratamiento que en B. La gráfica muestra la media de 3 repeticiones independientes y la SEM (desviación estándar de la media). Test t de Student para datos no pareados: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ . E: Eribulina; G: Gemcitabina.

En el caso de la línea celular de LMS SK-UT-1, observamos resultados similares a los de 93T449: un incremento en la acumulación de focos y en los niveles proteicos de  $\gamma$ -H2AX cuando tratamos tanto con eribulina sola como en combinación con gemcitabina. Esta acumulación se incrementa en la combinación, y observamos una tendencia casi estadísticamente significativa ( $29,05 \pm 2,78$  en E12G6H vs  $17,93 \pm 1,57$



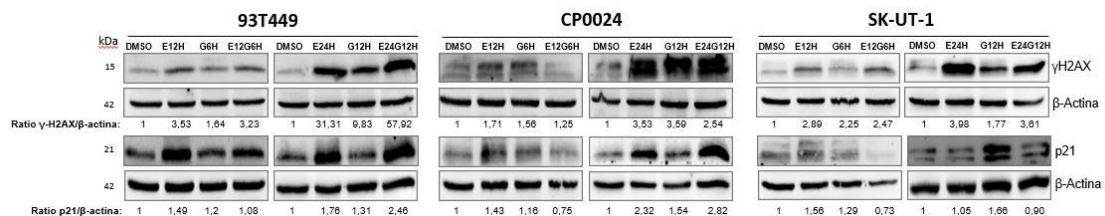
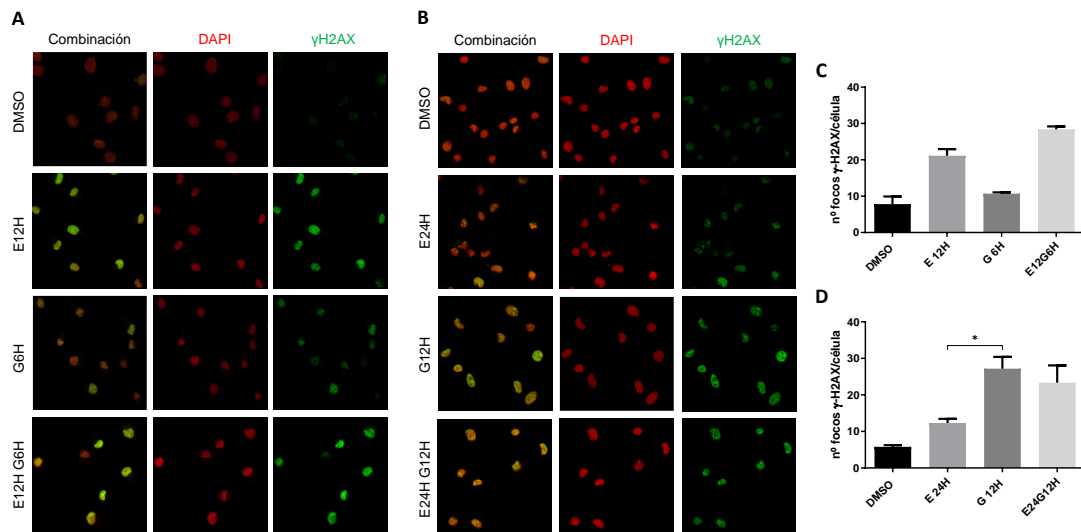
**Figura 42: Estudio del daño al ADN tras la combinación de eribulina y gemcitabina en la línea celular SK-UT-1.** (A) Inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ -H2AX tras el tratamiento de 12 horas con eribulina (1 nM) y/o 6 horas con gemcitabina (3 nM). Las células se tiñeron con el colorante DAPI (control nuclear, rojo) y con el anticuerpo contra  $\gamma$ -H2AX (verde). (B) Inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ -H2AX tras el tratamiento de 24 horas con eribulina (1 nM) y/o 12 horas con gemcitabina (3 nM). Las células se tiñeron con el colorante DAPI (control nuclear, rojo) y con el anticuerpo contra  $\gamma$ -H2AX (verde). (C) Cuantificación del número de focos por célula tras el mismo tratamiento que en A. (D) Cuantificación del número de focos por célula tras el mismo tratamiento que en B. La gráfica muestra la media de 3 repeticiones independientes y la SEM (desviación estándar de la media). Test t de Student para datos no pareados: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ . E: Eribulina; G: Gemcitabina

en E12H;  $p=0,073$  y  $33,9 \pm 5,44$  en E24G12H vs  $16,62 \pm 0,85$  en E24H;  $p=0,088$ ) (Figura 42). Los niveles de proteína de  $\gamma$ -H2AX son similares entre la combinación y la monoterapia con eribulina en la línea celular SK-UT-1 (Figura 44). Para la línea celular de LMS CP0024 observamos resultados similares en el experimento 12-6H, una acumulación de focos cuando tratamos tanto con eribulina como con la combinación ( $23,34 \pm 4,74$  en E12G6H vs  $12,33 \pm 1,12$  en E12H;  $p=0,152$ ) y en la secuencia de 24-12H, también observamos una acumulación de focos de  $\gamma$ -H2AX tratando con gemcitabina, que no observamos en las otras líneas celulares, existiendo una diferencia significativa entre G12H y E24H ( $27,19 \pm 3,2$  vs  $12,33 \pm 1,12$ ;  $p=0,049$ ) (Figura 43). Cuando observamos los niveles de proteína por Western-blot, observamos la misma acumulación de  $\gamma$ -H2AX que por IF, haciéndose evidente una acumulación tras 24 h de eribulina, 12 h de gemcitabina y la combinación de ambas (Figura 44).

Asimismo, a la vez que observamos una acumulación de  $\gamma$ -H2AX, los niveles de proteína p21 se incrementaron con el tratamiento con eribulina, tanto en monoterapia como en combinación en líneas celulares 93T449 y CP0024 (Figura 44). Además, estudiamos los niveles por proteína de p21 en dichas condiciones, observando un



aumento, sobre todo en el esquema de 24-12 h, tanto con eribulina como con la combinación en las líneas celulares 93T449 y CP0024.



## 2. Estudios *in vivo*

### 2.1. Caracterización de los modelos xenoinjertados derivados de pacientes de leiomiocarcinoma y liposarcinoma

Se generaron 5 modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX, del *inglés patient derived xenograft*) de LMS y uno de LPS. En la tabla 17 se recogen las características clínicas de los pacientes de los que derivan dichas muestras, junto a los tratamientos que habían recibido hasta el momento en el que se recogieron las muestras y el establecimiento del modelo. La mayoría de ellos, si no eran ya metastásicos de inicio, acabaron recidivando y metastatizando, pasando así por las diversas opciones de tratamiento de segundas y sucesivas líneas disponibles hasta la fecha. De los modelos utilizados, dos de ellos recibieron gemcitabina en combinación con DTIC (dacarbazina) (LMS-IBiS-001 y LMS-IBiS-009) y el modelo LMS-IBiS-002, recibió gemcitabina en combinación con docetaxel con anterioridad a la obtención de la muestra.

En cuanto a las características histopatológicas de los tumores de pacientes, la mayoría contaban con un alto índice mitótico y eran positivos para actina del músculo liso (AML) y muchos de ellos también para desmina, ambos marcadores de músculo esquelético.

Tabla 17: Características clínicas e histopatológicas de los xenoinjertos derivados de pacientes.

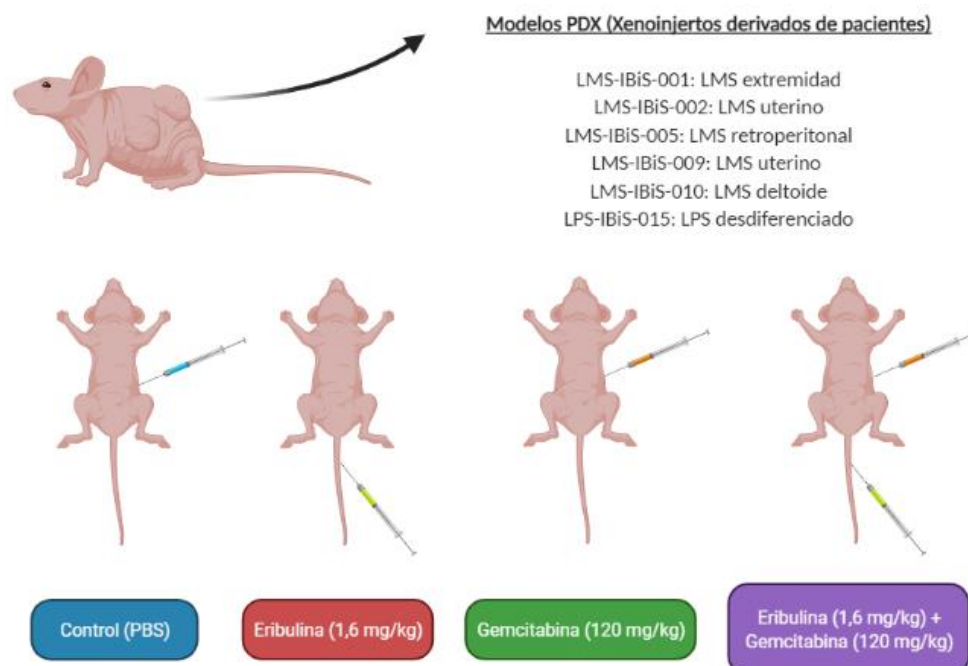
PDX	SEXO	EDAD AL DIAGN. (Años)	SUBTIPO HISTOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS-MOLECULARES	METASTASIS AL DIAGNÓSTICO	TERAPIAS PRE-MUESTRA	TERAPIAS POST-MUESTRA	ESTADO EN EL ÚLTIMO CONTROL
LMS-IBiS-001	Mujer	70	LMS extremidad	Alto índice mitótico Positivo AML Negativo EMA, desmina, miogenina, S-100, melan-A y CD34 No expresa MDM2	No	No	Amputación EPI + IFO Pazopanib Trabectedina + RT GEM + DTIC Selinexor	Fallecida
LMS-IBiS-002	Mujer	53	LMS uterino	Alto índice mitótico Haces de células fusiformes pleomorismo nuclear.	No	IQ GEM + Docetaxel RT + BraquiT Trabectedina	Olaratumab + DXR Pazopanib	Fallecida
LMS-IBiS-005	Mujer	42	LMS retroperitoneal	Alto índice mitótico Positivo actina, WT1 y EMA Negativo CD34, CD117, PS100, calretinina, miogenina, MyoD1, CKAE1/AE3, HMB45, TFE-3.	Sí (Pulmón e hígado)	No	Olaratumab + DXR Trabectedina	Fallecida
LMS-IBiS-009	Mujer	42	LMS uterino	Alto índice mitótico Necrosis tumoral Atipia citológica Positivo AML, desmina, caldesmon, p16, receptores estrógenos y progesterona	Sí (Pulmón, hígado, y óseas)	IQ	Olaratumab + DXR Olaratumab + GEM Pazopanib Trabectedina GEM + DTIC Eribulina RT paliativa Ciclofos. metronó.	Fallecida
LMS-IBiS-010	Hombre	59	LMS deltoides	Positivo AML, desmina. Negativo caldesmon	Sí (Pulmón)	No	Olaratumab + DXR Trabectedina + RT	Vivo con enfermedad
LPS-IBiS-015	Hombre	53	LPS indiferenciado	Positivo MDM2, AML y desmina. Negativo miogenina, CD117, DOG1 y S100.	No	No	IQ EPI + IFO	Fallecido

AML: actina del músculo liso; BraquiT: braquiterapia; DOG1: del inglés, *discovered on GIST-1* (descubierto en GIST); DTIC: dacarbazina; DXR: doxorubicina; EPI: epirubicina; EMA: antígeno epitelial de membrana, del inglés *Epithelial Membrane Antigen*; GEM: gemcitabina; IFO: ifosfamida; IQ: intervención quirúrgica o resección; LMS: leiomiocarcinoma; LPS: liposarcinoma; MDM2: del inglés, *murine double minute 2*; RT: radioterapia.



## 2.2. Primera aproximación *in vivo*: prueba piloto en varios modelos de leiomioma y liposarcoma.

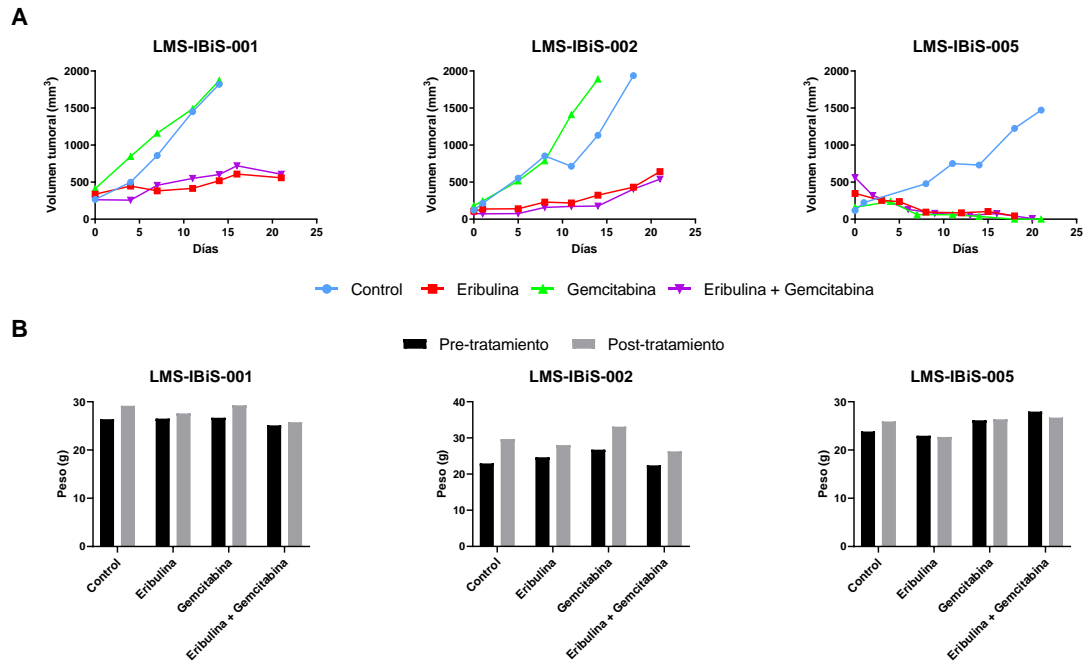
Se realizó una prueba piloto de la viabilidad de la combinación en los 5 modelos de LMS (LMS-IBiS-001, LMS-IBiS-002, LMS-IBiS-005, LMS-IBiS-009, LMS-IBiS-010) y en el modelo de LPS (LPS-IBiS-015). Para ello, se utilizó un ratón por cada uno de los 4 grupos de tratamiento: el grupo control, tratado con PBS intraperitoneal; el grupo con eribulina en monoterapia intravenosa (1,6 mg/kg), el grupo con gemcitabina en monoterapia intraperitoneal (120 mg/kg) y el grupo de la combinación de ambos fármacos, eribulina intravenosa (1,6 mg/kg) 2h previamente al tratamiento con gemcitabina intraperitoneal (120 mg/kg) (Figura 45).



**Figura 45: Esquema de los modelos xenoinjertados utilizados y el tratamiento correspondiente.** Las dosis se expresan en miligramos de fármaco por kilogramo de peso del ratón.

Tras esperar a que el tumor llegara a un volumen de 150 mm<sup>3</sup> para comenzar el tratamiento, se trató a cada ratón con un ciclo de 21 días donde se administraba el tratamiento correspondiente al día 0 y 7 del ciclo, donde los animales fueron sacrificados. Esta aproximación fue llevada a cabo en los modelos LMS-IBiS-001, LMS-IBiS-002 y LMS-IBiS-005, modelos de biología tumoral más rápida, que llegan a alcanzar volúmenes en el rango del sacrificio por cuestiones éticas a los 21 días. Se observó que existía una diferencia en el volumen tumoral entre el control y gemcitabina, y los dos grupos que recibieron eribulina, sin observar una diferencia clara entre eribulina en monoterapia y la combinación en ninguno de los casos a los 21 días (559,3 mm<sup>3</sup> frente a 697,3 mm<sup>3</sup> en el modelo LMS-IBiS-001; 642,2 mm<sup>3</sup> frente a 540,5 mm<sup>3</sup> en el modelo LMS-IBiS-002 y 44,6 mm<sup>3</sup> frente a 8,7 mm<sup>3</sup> en el modelo LMS-IBiS-005). Además, en el modelo LMS-IBiS-005 se observó como gemcitabina ejerció también un

efecto anti-tumoral. En los tres modelos, la eribulina fue capaz de detener el crecimiento del tumor o incluso disminuirlo en un ciclo de 21 días de tratamiento (Figura 46A). Además, los ratones no presentaron aparentemente signos de toxicidades significativas ni sufrieron pérdida de peso por el tratamiento en ninguno de los modelos estudiados (Figura 46B).

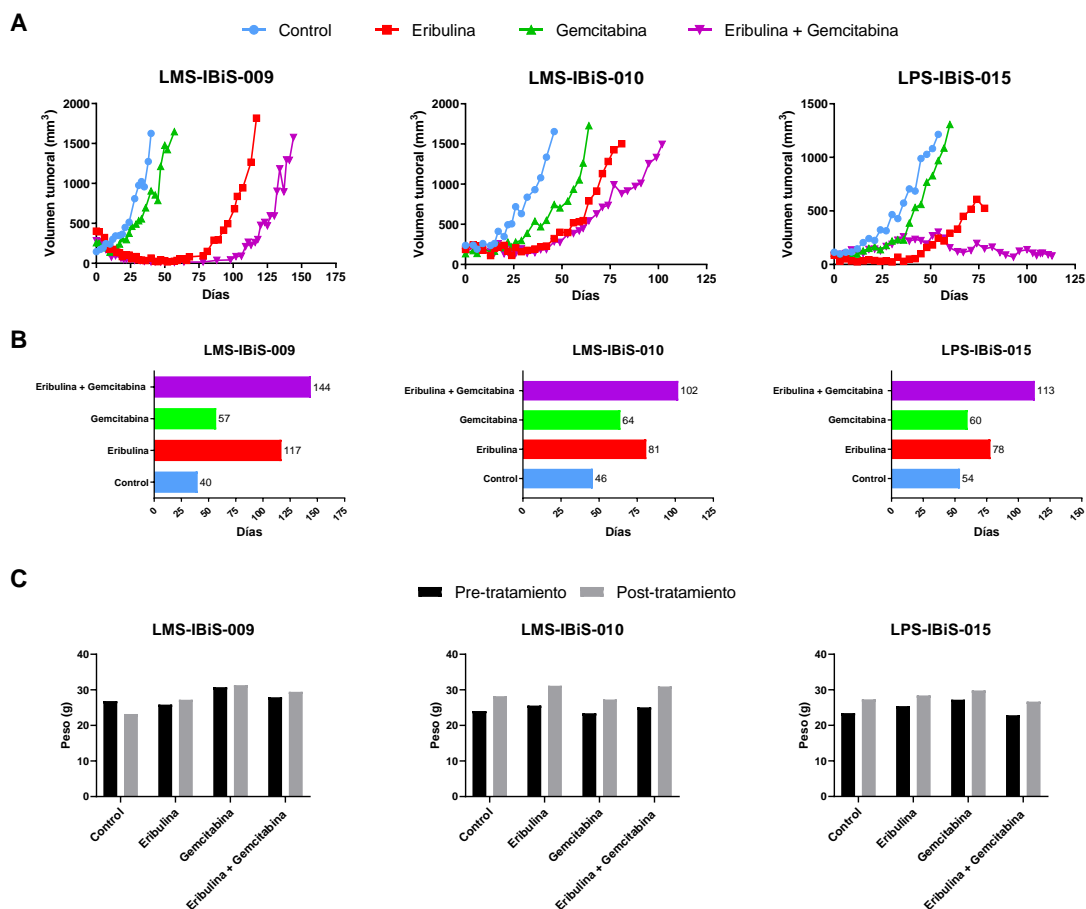


**Figura 46: Aproximación *in vivo* de la combinación de eribulina y gemcitabina en los modelos LMS-IBiS-001, LMS-IBiS-002 y LMS-IBiS-009.** (A) Volumen tumoral, expresado en  $\text{mm}^3$ , de cada ratón durante los 21 días de tratamiento. Los ratones fueron tratados con las concentraciones explicadas en la figura 9. (B) Peso, expresado en gramos, de cada ratón previo y posterior al tratamiento con cada uno de los fármacos.

Sin embargo, la aproximación de ciclos de 21 días no era efectiva para modelos de xenoinjerto con una biología tumoral y un crecimiento más lento. Por tanto, se decidió alargar el tiempo del experimento hasta que los volúmenes tumorales alcanzaran el volumen máximo ético permitido. Bajo esta aproximación, se estudió la combinación en dos modelos de LMS, LMS-IBiS-009 y LMS-IBiS-010, y un modelo de LPS, LPS-IBiS-015 con el mismo esquema de tratamiento, una dosis al día 0 y otra al día 7.

En los tres modelos de crecimiento lento se pudo observar como las curvas de crecimiento tumoral son bastantes similares en los primeros 21 días de monitorización del crecimiento, tras los cuales las curvas comienzan a separarse y en torno al día 50 los controles alcanzaron su volumen máximo. Los tumores de los ratones tratados con gemcitabina (en verde) también sufrieron un crecimiento exponencial y fueron sacrificados alrededor del día 50-75 (Figura 47A). En estos modelos, se observó como la eribulina, tanto en monoterapia como en combinación en los primeros días de monitorización fue capaz de mantener el volumen tumoral e incluso reducirlo en el caso

de los modelos LMS-IBiS-009 y LPS-IBiS-015. La diferencia entre los grupos de tratamiento de eribulina (en rojo) y eribulina y gemcitabina (en morado) en los modelos de LMS empezó a observarse aproximadamente a los 75 días de tratamiento, siendo la combinación el grupo de tratamiento capaz de mantener el volumen tumoral más bajo en los tres modelos. Se observó que los ratones que presentaron una mayor supervivencia, es decir, aquellos cuyo volumen máximo tumoral se alcanzó más tarde, fueron en los tres casos los ratones tratados con eribulina y gemcitabina (Figura 47B), alcanzando dichos volúmenes a los 144 días en el caso del modelo LMS-IBiS-009, a los 102 en el modelo LMS-IBiS-010 y a los 113 en el modelo LPS-IBiS-015. Además, en ninguno de los casos los ratones disminuyeron su peso a lo largo del tratamiento (Figura 47C).

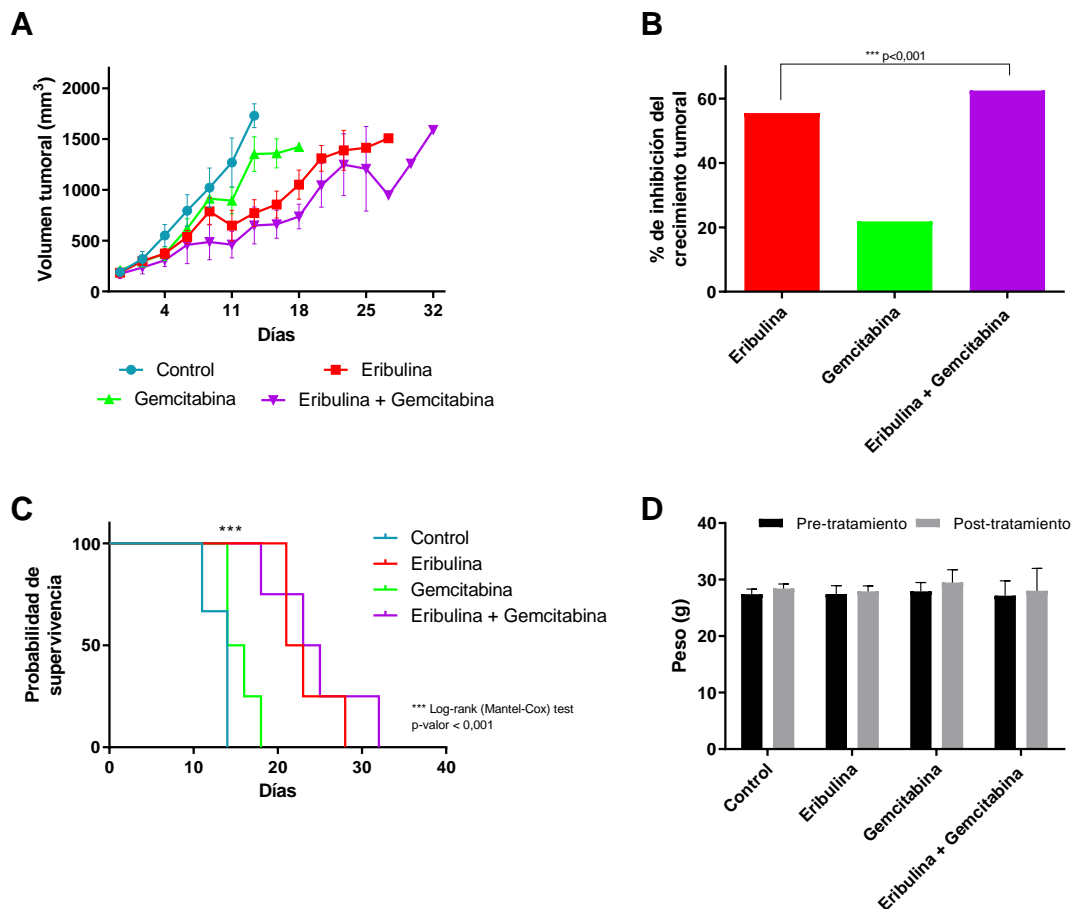


**Figura 47: Aproximación *in vivo* de la combinación de eribulina y gemcitabina en los modelos LMS-IBiS-009, LMS-IBiS-010 y LPS-IBiS-015.** (A) Volumen tumoral, expresado en  $\text{mm}^3$ , de cada ratón durante el experimento. Los ratones fueron tratados con las concentraciones explicadas en la figura 9. (B) Supervivencia, expresada en días, de los ratones asignados a cada tratamiento en los modelos de PDX LMS-IBiS-009, LMS-IBiS-010 y LPS-IBiS-015. (C) Peso, expresado en gramos, de cada ratón previo y posterior al tratamiento con cada uno de los fármacos.

### **2.3. Segunda aproximación: estudio del crecimiento tumoral y la supervivencia tras la combinación de eribulina y gemcitabina en los PDX seleccionados.**

Para evaluar la relevancia *in vivo* de la actividad de la combinación de eribulina y gemcitabina sobre el crecimiento tumoral y poder calcular la significancia estadística de esta combinación, se realizó un experimento con una  $n$  superior y se seleccionaron 3 de los modelos testados anteriormente: un modelo de LMS de crecimiento rápido (LMS-IBiS-002), un modelo de LMS de crecimiento lento (LMS-IBiS-010) y el modelo de LPS (LPS-IBiS-015). Los fragmentos de tumores obtenidos a partir del modelo PDX fueron injertados por vía subcutánea hasta alcanzar un tamaño de 150 mm<sup>3</sup> (Día 0). Los ratones recibieron un ciclo de dos dosis de fármacos administrados en el día 0 y el día 7 (ciclo de 21 días). En cada dosis, se testó la monoterapia con eribulina, con gemcitabina o la combinación de eribulina seguida de gemcitabina. Eribulina fue administrada intravenosa en la cola del ratón 2 h antes del tratamiento de gemcitabina inyectada intraperitonealmente (Figura 45). Con el fin de comprobar la posibilidad de que el efecto beneficioso de la administración secuencial de eribulina y gemcitabina pudiera observarse más adelante en el tiempo que en un ciclo de 21 días, decidimos dejar que los tumores crecieran hasta alcanzar un tamaño máximo de 1500 mm<sup>3</sup> después de un ciclo de tratamiento en los 3 modelos estudiados. Observamos que mientras que al principio del tratamiento tanto la monoterapia con eribulina como la combinación de eribulina más gemcitabina suprimen el crecimiento tumoral de manera similar, en momentos posteriores el régimen de combinación mantuvo una mejor supresión del crecimiento tumoral mientras que los tumores tratados solo con eribulina persisten creciendo. Este efecto se observa en el modelo LMS-IBiS-002 (Figura 48A) mostrando tanto una curva de Kaplan Meier significativa entre todos los grupos de tratamiento (p-valor en Log-rank (Mantel-Cox) test: < 0,001) (Figura 48D). El grupo de tratamiento combinado permanece vivo más días, mientras que el grupo de monoterapia con eribulina tuvo que ser sacrificado antes debido al crecimiento tumoral. También observamos que eribulina sola o en combinación con gemcitabina suprimió el crecimiento tumoral en comparación con ratones no tratados o tratados con gemcitabina (Figura 48A). Asimismo, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI, del inglés *tumor growth inhibition*) frente al control y al día 14 observamos que el TGI de eribulina + gemcitabina es mayor, de manera estadísticamente significativa, que

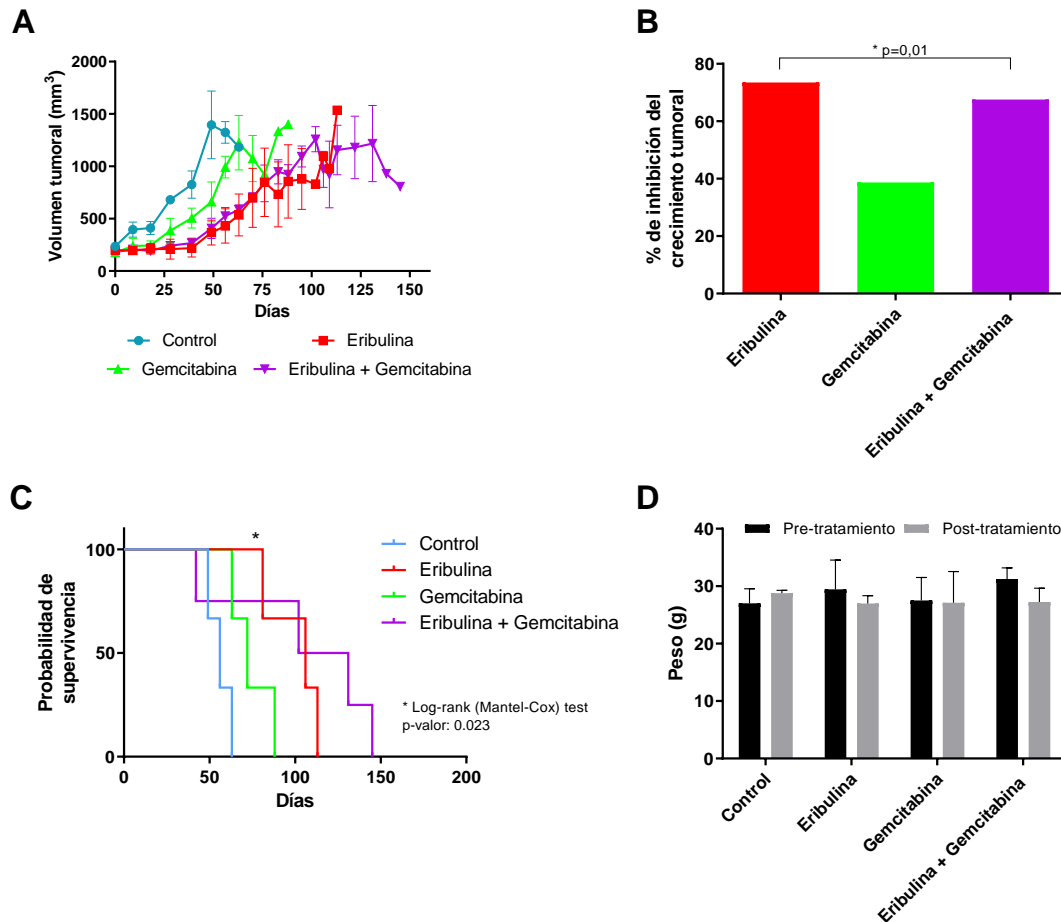
el TGI que produce eribulina en monoterapia (62,49 vs 55,48%;  $p < 0,001$ ; test de Wilcoxon) (Figura 48B).



**Figura 48: Efecto de la combinación de eribulina y gemcitabina *in vivo* en el modelo de PDX LMS-IBiS-002.** (A) Volumen tumoral, expresado en mm<sup>3</sup>, de los ratones sometidos a cada uno de los tratamientos: control (azul; n=3), eribulina en monoterapia (rojo; n=4), gemcitabina en monoterapia (verde; n=4) y eribulina + gemcitabina (morado; n=4). (B) Porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral con respecto al grupo control calculado al día 14 del tratamiento. Test de Wilcoxon para muestras pareadas: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  (C) Curva Kaplan Meier representando la probabilidad de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento. Test Log-rank (Mantel-Cox): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ . (D) Peso, expresado en gramos, de cada grupo experimental previo y posterior al tratamiento con cada uno de los fármacos.

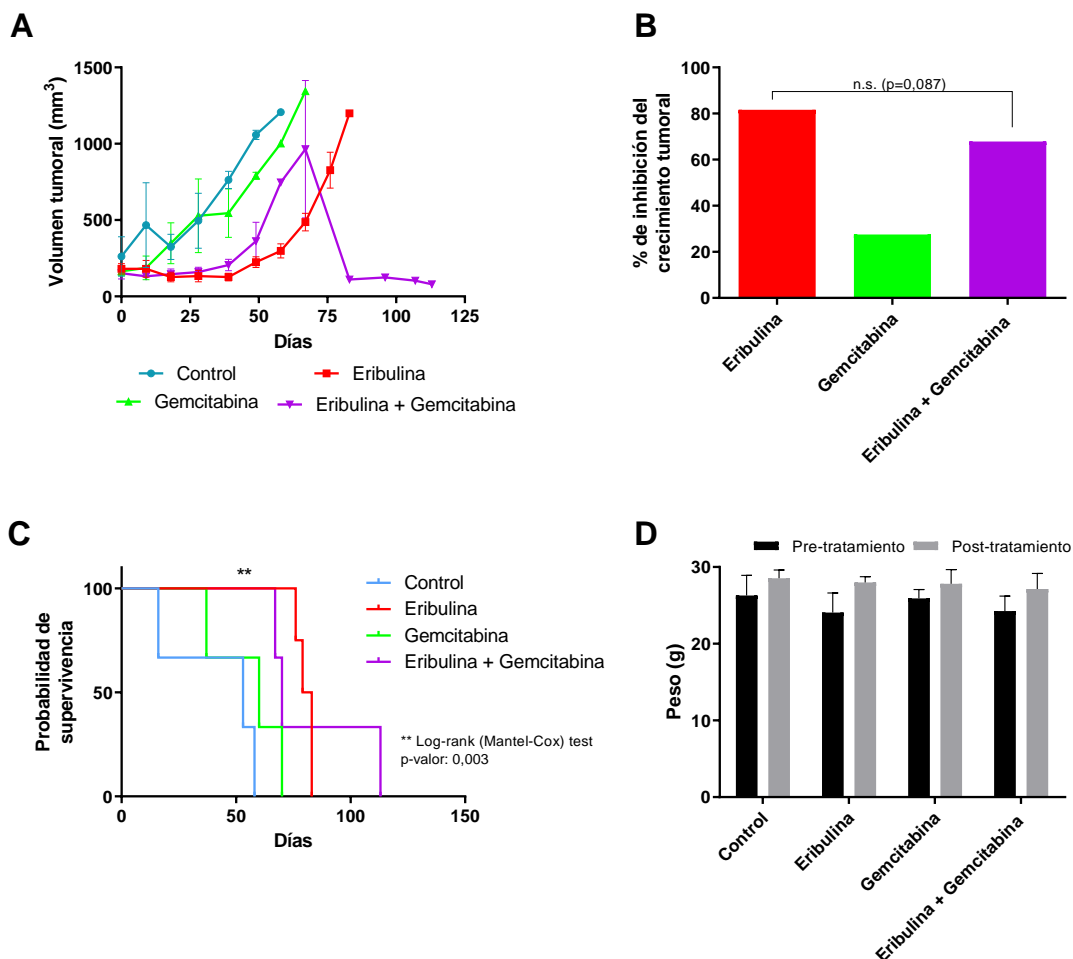
En el caso del modelo de LMS de crecimiento lento, LMS-IBiS-010, se hizo más evidente aún la similitud de las curvas de crecimiento tumoral de eribulina y la combinación, no alcanzándose las diferencias entre ambas hasta pasados los 100 días del comienzo del tratamiento (Figura 49A). Como en el modelo anterior, se vio que gemcitabina por si sola ejerce poco efecto antitumoral sobre dicho modelo, al igual que el control tratado con PBS. En cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral, se calculó al día 39 del tratamiento, no pudimos observar el mismo efecto que en modelo LMS-IBiS-001 ya que las diferencias entre eribulina y la combinación se alcanzaron cuando los ratones control ya habían sido sacrificados. Al día 39, se observó una inhibición mayor del crecimiento tumoral tratado con eribulina que con la combinación

(73,5 vs 67,59%;  $p=0,010$ , test de Wilcoxon) (Figura 49B). La curva Kaplan Meier de supervivencia nos muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos (Log-rank (Mantel-Cox) test  $p$ -valor: 0,023), mostrando una mayor supervivencia los ratones tratados con la combinación (Figura 49C). El peso corporal no se vio afectado por ninguno de los fármacos administrados (Figura 49 D).



**Figura 49: Efecto de la combinación de eribulina y gemcitabina *in vivo* en el modelo de PDX LMS-IBiS-010.** (A) Volumen tumoral, expresado en mm<sup>3</sup>, de los ratones sometidos a cada uno de los tratamientos: control (azul;  $n=3$ ), eribulina en monoterapia (rojo;  $n=3$ ), gemcitabina en monoterapia (verde;  $n=3$ ) y eribulina + gemcitabina (morado;  $n=4$ ). (B) Porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral con respecto al grupo control calculado al día 39 del tratamiento. Test de Wilcoxon para muestras pareadas: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  (C) Curva Kaplan Meier representando la probabilidad de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento. Test Log-rank (Mantel-Cox): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ . (D) Peso, expresado en gramos, de cada grupo experimental previo y posterior al tratamiento con cada uno de los fármacos.

En el caso del modelo PDX LPS-IBiS-015, las diferencias en el crecimiento tumoral entre el grupo de combinación y la eribulina también se lograron más tarde en el tiempo que en el ciclo de 21 días, como se pudo observar con anterioridad (Figura 50A). Calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral al día 42, se observó que tanto eribulina como la combinación tienen un mayor potencial antitumoral que gemcitabina, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (81,65 contra el 67,87%; n.s.; test de Wilcoxon) (Figura 50B). Asimismo, se calculó la curva *Kaplan Meier* entre todos los grupos de tratamiento, que resultó significativa (Log-rank (Mantel Cox) test p-valor: 0,003) (Figura 50C). Como en los otros modelos, el peso corporal de los ratones no se vio alterado por ninguno de los tratamientos (Figura 50D).



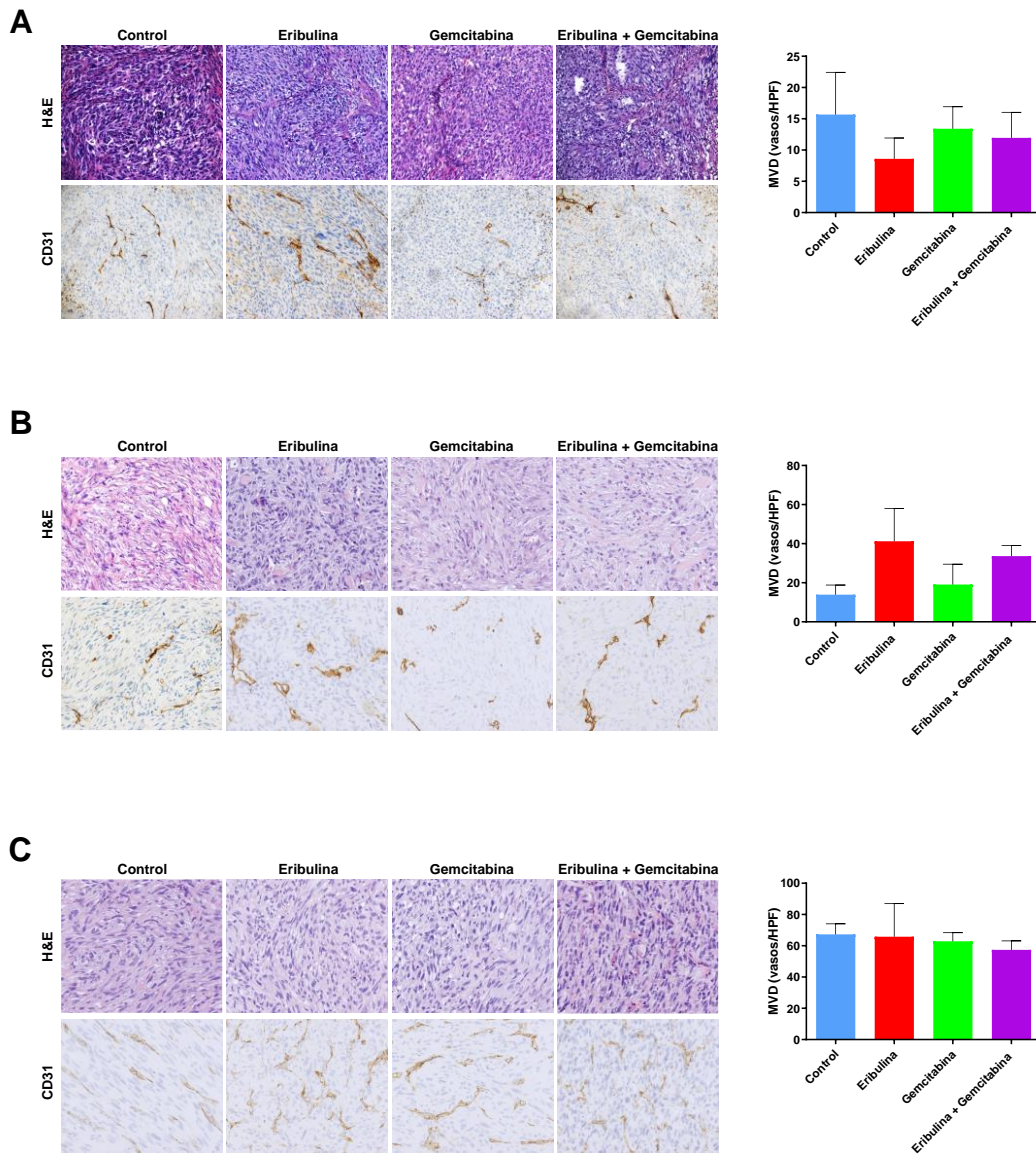
**Figura 50: Efecto de la combinación de eribulina y gemcitabina *in vivo* en el modelo de PDX LPS-IBiS-015.** (A) Volumen tumoral, expresado en mm<sup>3</sup>, de los ratones sometidos a cada uno de los tratamientos: control (azul; n=3), eribulina en monoterapia (rojo; n=4), gemcitabina en monoterapia (verde; n=3) y eribulina + gemcitabina (morado; n=3). (B) Porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral con respecto al grupo control calculado al día 42 del tratamiento. Test de Wilcoxon para muestras pareadas: \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005 (C) Curva Kaplan Meier representando la probabilidad de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento. Test Log-rank (Mantel Cox): \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005. (D) Peso, expresado en gramos, de cada grupo experimental previo y posterior al tratamiento con cada uno de los fármacos.

#### **2.4. Estudio de la vasculatura tumoral en respuesta al tratamiento de eribulina y gemcitabina.**

Atendiendo a las capacidades angiogénicas de eribulina, decidimos estudiar la formación de vasos en los tumores de nuestros 3 modelos de xenoinjertos, en respuesta al tratamiento. Las muestras parafinadas se marcaron con el anticuerpo contra CD31, que discrimina las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos de otras células del tumor. Las tinciones fueron examinadas por un patólogo experto y se calculó la densidad de microvasos en el tumor (MVD, del inglés *microvessels density*). Se localizaron las zonas consideradas como “*hot spots*” o zonas con alta densidad de microvasos, evitando las zonas necróticas y se contabilizaron el número de vasos por campos de alta potencia (HPF) en al menos 5 campos, cuando fue posible.

En el caso del modelo de crecimiento rápido LMS-IBiS-002, se observó que el grupo que presentaba una menor MVD fueron los tumores tratados con eribulina, no existiendo diferencias significativas entre ninguno de los grupos de tratamiento. En general, este modelo, presenta una alta celularidad, pero escasos microvasos (Figura 51A). En cambio, en el modelo LMS-IBiS-010, de crecimiento lento, el grupo tratado con eribulina fue el de mayor densidad de microvasos junto a la combinación, que fue el segundo grupo con mayor MVD. Por tanto, en dicho modelo, si destacan entre los grupos con mayor MVD los dos tratados con eribulina, pero la adición de gemcitabina no incrementa la MVD (Figura 51B). Por último, el modelo LPS-IBiS-015 fue el que mostró una mayor MVD (en torno a 60 microvasos por campo) pero no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos (Figura 51C).





**Figura 51: Inmunohistoquímica de CD31 en las muestras tumorales de los xenoinjertos derivados de pacientes.** Las gráficas muestran la densidad de microvasos (número de vasos por campo HPF) (media  $\pm$  SEM). (A) Imágenes de la hematoxilina y eosina (H&E) y tinción inmunohistoquímica con CD31 de las muestras tumorales del modelo LMS-IBiS-002 y el gráfico de barras de la MVD en dicho modelo. (B) Imágenes de la hematoxilina y eosina (H&E) y tinción inmunohistoquímica con CD31 de las muestras tumorales del modelo LMS-IBiS-010 y el gráfico de barras de la MVD en dicho modelo. (C) Imágenes de la hematoxilina y eosina (H&E) y tinción inmunohistoquímica con CD31 de las muestras tumorales del modelo LMS-IBiS-015 y el gráfico de barras de la MVD en dicho modelo. SEM: Desviación estándar de la media.



## Discusión



**Capítulo I: Estudio de la inhibición de MRP-1 en combinación con quimioterápicos como estrategia para revertir la resistencia a fármacos en sarcomas de partes blandas.**

La resistencia a múltiples fármacos es el conjunto de diferentes mecanismos que presentan las células que conforman un tumor, mediante el cual se hacen resistentes a compuestos como los agentes quimioterápicos, haciendo que el tumor continúe proliferando descontroladamente (184). A pesar de ser un proceso multifactorial, comúnmente se ve ocasionado por un aumento de la expresión o de la actividad de los transportadores ABC (60). En sarcomas, concretamente, en SPB localmente avanzados de alto riesgo, se demostró que la combinación de sobreexpresión de MRP-1 en muestras tumorales tanto por ARNm como por proteína fue el único factor pronóstico de manera retrospectiva (84). Las muestras tumorales, en las que se obtuvo ese resultado, pertenecían a los pacientes del ensayo fase III llevado a cabo en por el *Italian Sarcoma Group* (ISG) en colaboración con el Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS), en el cual recibían 3 o 5 ciclos de epirrubicina (120 mg/m<sup>2</sup>) e ifosfamida (9.000 mg/m<sup>2</sup>). Los 3 primeros ciclos eran en neoadyuvancia en ambos grupos y los 2 siguientes en adyuvancia para el grupo de 5 ciclos (185). En nuestro caso, las muestras tumorales provienen del ensayo clínico en fase 3 realizado por el ISG, GEIS, FSG (*French Sarcoma Group*) y PSG (*Polish Sarcoma Group*) en el que se compara la quimioterapia estándar en neoadyuvancia (epirrubicina más ifosfamida) versus quimioterapia neoadyuvante según histotipo (31). Se trata de un ensayo internacional, abierto, randomizado, controlado y multicéntrico en el cual hemos validado el papel predictivo para resistencia de la expresión proteica de MRP-1, tanto en SLP como en SG en pacientes con SPB localizado de alto riesgo tratados con el brazo control de este ensayo (epirrubicina más ifosfamida). Cabe destacar que la correlación predictiva significativa con el resultado clínico se logró con datos provenientes de dos patólogos independientes en una revisión por pares cegada para los datos clínicos, dentro de dicho ensayo multicéntrico. Este análisis fue un proyecto de investigación traslacional planificado y vinculado al ensayo ISG-STG 1001 comentado previamente.

Entre las proteínas asociadas a la multirresistencia a fármacos, seleccionamos solamente la expresión de MRP-1, basándonos en el estudio traslacional previo del laboratorio (84). MRP-1 destaca por dirigir el eflujo de conjugados de oxazafosforinas, incluyendo ifosfamida (186, 187) y antraciclinas (188). Por tanto, se trata de un factor predictivo clave para la multirresistencia a fármacos, en el contexto de pacientes afectados por los subtipos de sarcoma de extremidades más frecuentes y tratados con dicha combinación de fármacos. De hecho, en el análisis multivariante de nuestra serie, la intensidad de la expresión de MRP-1 demostró ser un factor independiente. Por otra

parte, en una pequeña serie de 29 SPB localizados tratados con doxorubicina, dacarbazina e ifosfamida en el contexto neoadyuvante, la respuesta patológica se correlacionó con la expresión de P-gp, único factor de multirresistencia a fármacos (MDR) analizado en el estudio. Nueve de cada 10 casos (90%) con expresión positiva de P-gp tuvieron una respuesta deficiente, mientras que sólo 7 sobre 19 (36%) casos P-gp-negativos tuvieron una respuesta deficiente ( $p=0,008$ ) (189). Sin embargo, en otra serie corta de 44 pacientes con SPB, no se encontró correlación pronóstica significativa entre la expresión de P-gp y el resultado clínico (190). Del mismo modo, nuestro análisis previo no mostró ninguna asociación de la expresión de P-gp o glutatión S-transferasa pi (GST- $\pi$ ), otra proteína relacionada con MDR, con el resultado clínico (84). Estos resultados contradictorios sobre P-gp podrían deberse a la heterogeneidad en los subtipos y grados de sarcoma incluidos en estos análisis.

Cabe destacar que la sobreexpresión de MRP-1 se ha correlacionado directamente con un alto grado en SPB pediátricos (81). En línea con nuestro estudio traslacional, una mayor expresión proteica de MRP-1 se ha relacionado significativamente con un peor desenlace clínico en series retrospectivas de neuroblastoma (191-193), mientras que P-gp no mostró correlación pronóstica. También en leucemia linfoblástica aguda y cáncer de pulmón de células no pequeñas, localmente avanzado y tratado con neoadyuvancia, se ha asociado una alta expresión de MRP-1 con la disminución en SLP y en SG respectivamente (194, 195). De forma similar, en una serie de 516 pacientes con cáncer de mama precoz, incluidos en el ensayo aleatorizado ABCSG 5 que comparaba CMF (ciclofosfamida – metotrexato – fluorouracilo) frente tratamiento adyuvante endocrino, la alta expresión (> 30%) de MRP-1 por inmunohistoquímica se relacionó significativamente con una peor SLP y SG. Curiosamente, una mayor expresión de MRP-1 mostró un valor pronóstico independiente solo en pacientes tratadas con quimioterapia, pero no en aquellas tratadas con terapia endocrina (196).

La predicción del valor de MRP-1 en resistencia varió entre los subtipos de sarcoma en nuestro estudio, lo que sugiere que nuestra hipótesis no puede generalizarse a todas las histologías de SPB tratadas con antraciclinas e ifosfamida. De hecho, la sobreexpresión de esta bomba de eflujo no mostró un papel predictivo para mixofibrosarcomas en esta serie. Es una entidad con una alta recurrencia local y no se habían descrito factores pronósticos hasta el estudio de Ogura *et al.* donde alteraciones en reguladores del ciclo celular se asociaron con una peor SG (197). Además, es dudoso que la expresión de MRP-1 ejerza una influencia predictiva relevante en LPS mixoide de alto grado de acuerdo con la experiencia de series anteriores y actuales. En LPS, MRP-1 mostró la expresión más baja por proteína en esta serie, lo que está en línea con

otras observaciones que miden la expresión por ARNm de MRP-1 (75). Será importante describir los procesos biológicos subyacentes a la resistencia a fármacos en estos subtipos, que parece ser a través de diferentes mecanismos, además de la actividad de MRP-1. Por el contrario, la expresión de MRP-1 mostró un papel predictivo significativo en algunos subtipos específicos de SPB, como el sarcoma sinovial y el MPNST. En un estudio reciente de MPNST avanzados, doxorubicina e ifosfamida fue el esquema que produjo una mayor SLP en comparación a otros esquemas, aunque los pacientes acaban recidivando (198), pudiendo deberse en parte a la MDR. Es posible que esta combinación junto a un inhibidor de MRP-1 pudiera ser más activa en el contexto clínico. Sería además interesante poder validar a nivel de ARN mensajero los resultados obtenidos por proteína, pero la escasez de material no lo ha permitido en nuestro caso. Aunque nuestros resultados indiquen que MRP-1 es un biomarcador predictivo para la combinación de antraciclinas con ifosfamida en pacientes con SPBs localizados de alto riesgo, el valor pronóstico potencial de MRP-1 no se puede descartar completamente en función de los resultados, ya que no se incluyó en el ensayo un brazo sin quimioterapia perioperatoria. Asimismo, sería interesante realizar un *score* de la tinción de MRP-1 que integrase tanto la intensidad como la expresión de la tinción en nuestras muestras para permitirnos dilucidar si existe una prevalencia de una de estas dos variables en el resultado.

Una vez validado el valor predictivo de MRP-1, surge la necesidad de explorar la combinación de un inhibidor de esta proteína junto con agentes sistémicos que sean sustratos de dicha bomba de eflujo con el objetivo de revertir la resistencia a los fármacos. Entre la plétora de compuestos que han mostrado efectos inhibitorios sobre las bombas de eflujo ABC en los últimos años (85), decidimos testar nuestras líneas de SPB con probenecid y MK-571, inhibidores clásicos de esta bomba de eflujo y compararlos con inhibidores de quinasas y tirosina quinasas como nilotinib, selumetinib, ripretinib y avapritinib. Villar *et al.* demostraron que nilotinib potencia el efecto de doxorubicina en líneas celulares de sarcoma, observando un aumento significativo de la apoptosis, una disminución en la proliferación celular a los 12 días tras la retirada de los compuestos, probablemente relacionada con un aumento de la acumulación de doxorubicina en las células de sarcoma y un aumento de más de 11 veces de CFDA (sustrato específico de MRP-1) con respecto a la acumulación lograda con probenecid (108). En las líneas celulares de leucemia mieloide crónica, nilotinib demostró ser el inhibidor más potente de P-gp, BCRP y MRP-1, sobre imatinib y dasatinib. Los autores sugirieron que las dosis terapéuticas de nilotinib pueden disminuir la MDR, especialmente la mediada por P-gp y BCRP (199). En nuestro estudio, avapritinib y

nilotinib mostraron una mayor inhibición de la actividad de MRP-1, en comparación con probenecid y MK-571, lo que sugiere que la eficacia de estos inhibidores clásicos de la bomba de eflujo es de alguna manera limitada en el contexto de los SPB y que determinados inhibidores tirosina quinasa pueden ser potentes inhibidores de esta bomba de eflujo. Avapritinib no había sido testado previamente en SPB, ya que solamente está aprobado para tumores del estroma gastrointestinal (GIST) con mutación en el exón 18 de PDGFR $\alpha$ , incluyendo la mutación D842V (200, 201). La inhibición de la actividad de MRP-1 se midió por la acumulación de CFDA (sustrato específico de dicha bomba) y por acumulación de doxorubicina intracelular. En este último ensayo se observó una superioridad de nilotinib sobre avapritinib, ya que este último solo es capaz de provocar una acumulación de doxorubicina en la línea de LMS SK-UT-1. Esta superioridad puede deberse a la mayor afinidad que muestra dicha molécula por este transportador en nuestros estudios *in silico* o porque nilotinib pueda estar teniendo parte de su efecto a través de P-gp, ya que está descrito que es modulador de ambas bombas (108).

Otro de los efectos que pueden generar dichos TKIs sobre las células tumorales, además de la bajada de actividad de los transportadores, es la bajada de expresión de estas proteínas (108, 199). Hemos obtenido una bajada muy leve en los niveles de ARNm de *ABCC1* en ambas líneas celulares tras el tratamiento con cualquiera de los dos TKIs, en torno al 10-20%. En el caso de nilotinib, esta bajada puede deberse a su efecto sobre las vías de señalización AKT y MAPK ya que está descrito que una activación de la vía MAPK/ERK está involucrada en la sobreexpresión de *ABCB1*, ERK y *ABCC1* (202, 203). Nuestros TKIs de interés estarían ejerciendo su efecto de inhibición de la actividad de MRP-1 pero dicha bajada en la actividad no se corresponde con una menor expresión del transportador.

Además de su función como inhibidor de KIT, se ha estudiado la capacidad de avapritinib para revertir la MDR dependiente de los transportadores *ABCB1* y *ABCG2* en un panel de líneas celulares de cáncer (114). En dicho estudio comprueban la capacidad de avapritinib para incrementar la acumulación intracelular de diferentes drogas sin cambiar la expresión proteica de los transportadores. Asimismo, realizaron un estudio de *docking* molecular del bolsillo de unión de drogas de ambos transportadores con avapritinib. En nuestro estudio, de igual forma, hemos realizado el estudio de acoplamiento molecular con *Autodock* observando que existe una alta afinidad tanto de nilotinib como de avapritinib por MRP-1 siendo más afín la unión con nilotinib, superando al resto de moléculas estudiadas. Es cierto que otras moléculas testadas, como es el caso de ripretinib mostraron afinidad por MRP-1, en cierto modo



esperada y similar a avapritinib, pero en los experimentos en líneas celulares de sarcoma, su actividad inhibitoria para MRP-1 fue claramente inferior a nilotinib o avapritinib. Recientemente, se ha combinado ripretinib con inhibidores de la vía MAPK en GIST y células de mastocitosis, con el potencial de vencer la reactivación de los mecanismos de resistencia compensatoria (204). Serían necesarios más estudios para dilucidar el papel de esta molécula en la MDR.

El modelaje de MRP-1 ha sido realizado sin la estructura cristalizada de la proteína, ya que a día de hoy, aún no se conoce (188). Con el acoplamiento molecular se han testado otro tipo de inhibidores para MRP-1 como derivados de dihidropiridinas (205), curcumina (206) y citrato de potasio (207), al igual que para otros transportadores como *ABCB1* y *ABCG2* (208, 209). Es el caso también de dacomitinib que estudiándolo por *docking* molecular se ha comprobado que se une al dominio transmembrana de *ABCB1* y *ABCG2*, inhibiendo la actividad del transportador (210). En nuestro caso, tanto avapritinib como nilotinib se acoplan al dominio transmembrana de los transportadores con gran afinidad, pudiendo ejercer un bloqueo de este y de dicha forma, la inhibición de su actividad, compitiendo directamente con los sustratos de dicha bomba. Esto ya había sido previamente descrito para avapritinib pero en relación con las bombas *ABCB1* y *ABCG2* (114). Tras la caracterización de la acción de dichas moléculas en nuestras líneas con las diferentes aproximaciones, se pudo concluir que nilotinib y avapritinib eran los inhibidores de MRP-1 más potentes.

La estrategia de inhibición de la actividad del transportador MRP-1 junto con otros quimioterápicos, para aumentar su concentración intracelular y así su acción, ha sido utilizada en otros tumores con diferentes TKIs, entre ellos nilotinib, pero no avapritinib, a nivel preclínico. Ibrutinib ha sido testado, en células de leucemia con sobreexpresión de MRP-1, en combinación con fármacos expulsados por MRP-1 como vincristina, vinblastina o doxorubicina, sensibilizándolas a dichos tratamientos y no a otros no-diana de MRP-1 (211). Nilotinib también sensibiliza células de leucemia a daunorrubicina, haciendo que a su vez aumente la apoptosis tras el tratamiento combinado (212). Asimismo, tras un screening de TKIs, en líneas KBV20C resistentes a fármacos antimitóticos (sobreexpresan P-gp), demostraron que lapatinib incrementaba la apoptosis en combinación con vincristina ya que las hacía más sensibles por su papel inhibitorio sobre P-gp (213). En este mismo modelo celular, crizotinib en bajas dosis es capaz de sensibilizar dichas células, provocando una parada en G2-M e induciendo muerte celular apoptótica (214). Los TKIs, además de ser inhibidores también son sustrato de las bombas de eflujo ABC, y en ciertos estudios se trata de sensibilizar el efecto de un TKI, en estos casos, afatinib y dasatinib, con otro TKI como nilotinib (215,

216). En nuestro estudio, gracias a nilotinib y avapritinib hemos sensibilizado las líneas celulares SK-UT-1 y CP0024 al tratamiento con doxorubicina y palifosfamida. La bajada en viabilidad celular es bastante acusada en SK-UT-1 tratada con avapritinib a altas y bajas concentraciones de los tres fármacos, existiendo también una bajada significativa de la capacidad de generar colonias de dicha línea tras el mismo tratamiento y un aumento de células apoptóticas. En CP0024 la diferencia es menor en viabilidad, pero sin embargo la apoptosis dobla su valor entre el tratamiento con la triple y la doble combinación.

Algunos modelos utilizan nilotinib como modulador de la resistencia a través de P-gp y BCRP, pero pocos son los que dan evidencias a través de MRP-1 (110, 217). Nosotros hemos observado que, en nuestras líneas de SPB, nilotinib ejerce un mayor efecto sobre MRP-1 y que este efecto es específico ya que al utilizar un siARN frente a *ABCC1*, obtenemos resultados similares en cuanto a acumulación intracelular de CFDA (y no de Rho-123) y al aumento de la apoptosis tras la triple combinación de fármacos, comprobación que previamente no se había realizado para MRP-1 ni P-gp (108). En cuanto al efecto de nilotinib, se alcanzaron diferencias significativas tanto a altas como a bajas concentraciones de los tres fármacos en la línea SK-UT-1, que se corrobora con la bajada en viabilidad observada en el ensayo clonogénico de la misma línea y con un aumento significativo de la apoptosis entre la triple y la doble combinación. Ocurre lo mismo que con avapritinib en CP0024, a altas concentraciones de fármacos si observamos una gran diferencia en viabilidad entre doble y triple combinación, que se corroboran con las diferencias observadas en apoptosis. Para validar dichos resultados antes de llevarlos a la clínica serían muy necesarios experimentos *in vivo* que prueben que la combinación de estos inhibidores de MRP-1 con antraciclinas e ifosfamida es capaz de controlar el crecimiento tumoral.

La primera evidencia de la ventaja clínica a través de la modulación del transportador ABC provino de 3 ensayos aleatorizados, que informaron de una SG significativamente más larga en el brazo tratado con inhibidores de los transportadores ABC. Los pacientes con leucemia mieloide aguda que fueron tratados con daunorrubicina más citarabina junto con ciclosporina, un inhibidor de P-gp, tuvieron tasas significativamente mejores de SLP y SG en comparación con el brazo sin ciclosporina, 34% vs 9% y 22% vs 12%, respectivamente. El máximo beneficio se detectó en pacientes con una mayor expresión de P-gp, aunque los niveles de MRP-1 no fueron analizados (218). Por otra parte, dos ensayos aleatorizados adicionales demostraron una SG estadísticamente significativa en los brazos donde se agregó verapamil a los regímenes de quimioterapia de pacientes con cáncer de mama

resistente a antraciclinas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, sin embargo, no se describió ninguna correlación entre niveles de MRP-1 y supervivencia (219, 220). En pacientes con sarcoma, la combinación de nilotinib y doxorubicina se probó en un ensayo fase I. De manera notoria, se observó una correlación entre la expresión proteica y la respuesta radiológica observada entre la biopsia basal y la posterior al 4º ciclo. En términos de actividad, entre 13 pacientes se observaron 2 respuestas parciales (una de ellas en el componente desdiferenciado del LPS), 8 enfermedades estables y 3 progresiones (109). La fase II de este ensayo, se realizó con el mismo esquema en un entorno neoadyuvante en LPS retroperitoneales y LMS. En ambas partes del ensayo, el esquema fue factible y seguro, con el uso de GCSF después de detectar alguna recuperación incompleta de neutrófilos en el día 21. Es el único ensayo realizado en sarcomas con nilotinib como inhibidor de bombas de eflujo y los resultados del ensayo fase II se esperan para comprobar la actividad de esta combinación (datos no publicados). En cambio, no existen ensayos clínicos que utilicen avapritinib como inhibidor de transportadores ABC en SPB ni en otras neoplasias a excepción de GIST (201), donde se ha observado que incluso a largo plazo fue capaz de alcanzar una tasa de beneficio clínico del 98%, con escasas toxicidades asociadas (221). En la actualidad, se está probando la combinación de doxorubicina e ifosfamida en SPB en 4 ensayos clínicos: en segundas líneas en combinación con apatinib (94) [NCT04012827]; en neoadyuvancia se están testando dos fármacos anti-PD1, sintilimab [NCT04356872] y retifanlimab [NCT04968106] en combinación con doxorubicina-ifosfamida, y por último nivolumab en combinación con epirubicina e ifosfamida para UPS y LMS como nueva cohorte dentro del ensayo Immunosarc de nuestro grupo [NCT03277924], sin datos publicados hasta la fecha.

Con el fin de testar esta combinación en el contexto clínico, nuestros experimentos nos proporcionan el racional para diseñar un ensayo de fase I / II en SPB avanzados con el fin de implementarlo si se detectan signos de aumento de la actividad tumoral en SPB localizados de alto riesgo, a través de un ensayo aleatorizado. En este sentido, el inhibidor de MRP-1 actuaría como terapia coadyuvante a la quimioterapia estándar y, por lo tanto, se administraría durante un número limitado de días con el objetivo principal de retener los fármacos activos en las células tumorales durante más tiempo.



**Capítulo II: Estudio de la combinación de eribulina y gemcitabina en L-sarcomas: abordaje *in vitro* e *in vivo*.**

Para identificar una nueva estrategia en el tratamiento de los L-sarcomas, en segundas o sucesivas líneas, nos hemos centrado en la combinación de eribulina con gemcitabina. La eribulina es un agente que tiene su diana en los microtúbulos y que ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con LPS irsecables o metastásicos tratados previamente con antraciclinas (116, 222). El uso de eribulina para LMS no ha sido admitido debido a que, en un análisis por subgrupos, no hubo diferencias aparentes entre eribulina y dacarbazina (fármaco activo estándar en esta patología) en SG (12,8 meses en el brazo de eribulina y 12,3 en el de dacarbazina, respectivamente) ni tampoco en la SLP (2,6 meses en ambos brazos de tratamiento) (57). En nuestro estudio, hemos observado que la  $IC_{50}$  de eribulina para nuestras líneas celulares está en el rango nanomolar, como lo han demostrado Hayasaka *et al.* (223) y Stehle *et al.* (224) en un panel de línea celulares de SPB y concuerdan con los resultados recientemente obtenidos por Escudero *et al.* (225). Nuestras líneas celulares de LMS son más sensibles a la eribulina que las de LPS, a diferencia de lo que se publica en varios ensayos clínicos, por lo que proporcionamos nuevos datos que respaldan el uso de eribulina también para LMS. La mayor sensibilidad de los LPS en el contexto clínico se puede deber a que estos cuentan con un microambiente más favorable y enriquecido en células endoteliales, siendo este un nicho donde eribulina puede actuar con mayor facilidad (144, 226). Desde la aprobación de eribulina en SPB, múltiples ensayos clínicos están probando la seguridad y eficacia de eribulina en combinaciones con otros medicamentos como pembrolizumab (NCT03899805), lenvatinib (NCT03526679) o clorhidrato de irinotecán (NCT03245450), sin resultados publicados hasta la fecha. En cáncer de mama, patología para la cual también está aprobado el uso de eribulina, ésta ha sido combinada con diversos fármacos como anticuerpos monoclonales contra el receptor HER-2 o que bloquean dicha vía, como es el caso de pembrolizumab en un ensayo fase 2 randomizado frente a eribulina en monoterapia, sin aportar una mejoría en los datos de SLP y SG (227). Otros anticuerpos monoclonales utilizados recientemente en combinación con eribulina han sido trastuzumab, pertuzumab y también la combinación de ambos, con una modesta actividad clínica (228-232). En el caso de trastuzumab, un estudio observacional retrospectivo muestra prometedores resultados en cuanto a eficacia y tolerabilidad (233) y aunque, la mayoría de estos estudios se aplican a segundas líneas, en un estudio con intencionalidad de aplicar dicha combinación en primera línea también se han observado que es una combinación segura y eficaz (234). En nuestro estudio decidimos combinar eribulina con gemcitabina. Esta combinación ha sido testada en cáncer de mama: en Japón se realizó un ensayo

fase 1 en pacientes metastásicos, sin alcanzar la dosis recomendada para la fase 2 por toxicidades hematológicas (235). En otro estudio, el grupo coreano realizó un ensayo fase 2 randomizado con la combinación de eribulina y gemcitabina (EG) versus paclitaxel y gemcitabina (PG), en primera línea de tratamiento de pacientes HER-2 negativos, donde se observó que EG presenta un beneficio clínico similar a PG en términos de SLP, pero con una menor neurotoxicidad (236). Para las dosis utilizadas en dicho ensayo, se basaron en un ensayo de fase 1 en tumores sólidos avanzados (237). En estos momentos está en marcha en Corea un ensayo fase 2 de la combinación en L-sarcomas [NCT03810976], sin resultados hasta la fecha.

La combinación de eribulina con gemcitabina fue testada *in vitro*, en nuestras líneas de L-sarcomas, con tres secuencias diferentes: eribulina más gemcitabina, eribulina previa a gemcitabina y al contrario para encontrar el mejor esquema de combinación con el que obtener un fuerte sinergismo. Eribulina previa a gemcitabina demuestra ser el mejor enfoque, siendo la aproximación con un índice de combinación (CI) más bajo en nuestras líneas celulares. La  $IC_{50}$  es la dosis efectiva (o concentración) causante del 50% del máximo efecto para el efecto biológico de interés que estamos midiendo: la citotoxicidad o pérdida de viabilidad. En las dos líneas de LMS, CP0024 y SK-UT-1, la  $IC_{50}$  es menor en el caso de aplicar eribulina previamente a gemcitabina y en el caso de las de LPS, para 94T778 también es así pero no para 93T449, donde funcionaría mejor la concomitancia o gemcitabina previa a eribulina. En cuanto a los índices de combinación, se observó como a bajas concentraciones (0,1 y 1 nM) de ambos fármacos existe una fuerte sinergia en todas las líneas cuando tratamos con eribulina previa a gemcitabina. Esta sinergia es más potente a bajas concentraciones que a altas, como se ha reportado en otros estudios (238, 239), debido quizás a la elevada actividad de eribulina (concentraciones sub-nM y nM).

Otra forma de observar la disminución en la viabilidad celular es con ensayos de clonogenicidad. Ha sido descrito que eribulina, por sí sola o en combinación con otros agentes citotóxicos o radioterapia, es capaz de reducir la capacidad *in vitro* de las células para generar colonias, tanto en células de cáncer de pulmón como de sarcoma de ewing (141, 142, 240). En nuestras células hemos podido observar el mismo efecto de reducción de la clonogenicidad, efecto que además es dependiente del tiempo de exposición a eribulina. En el caso de gemcitabina, se ha descrito asimismo su potencial para reducir la capacidad clonogénica en monoterapia y combinación, tanto en cáncer de pulmón combinada con ácido gambogico, como en carcinoma de vejiga junto a un inhibidor de Chk1/2 (241, 242). Hemos observado una menor disminución de las colonias tratadas con gemcitabina que con eribulina en monoterapia en ambos casos,

demostrando que dicho fármaco no es tan potente en los L-sarcomas como puede serlo eribulina. La combinación de ambos provoca una bajada estadísticamente significativa de la clonogenicidad en la línea celular de LPS, que no observamos en las de LMS donde se observó que eribulina en monoterapia tiene un efecto superior sobre la clonogenicidad. Este hecho iría en contra de la sinergia observada en la viabilidad celular estudiada anteriormente, pero hay que tener en cuenta que ambas técnicas presentan limitaciones (243), influyendo además el tiempo de exposición diferente entre ambas.

Estudios preclínicos previos describieron la parada en G2-M que provoca eribulina, que se torna más pronunciada a medida que pasa el tiempo, llegando a ser una parada irreversible (150). Kuznetsov *et al.* caracterizaron minuciosamente el efecto de eribulina sobre la mitosis en modelos celulares de linfoma. Tras el tratamiento con eribulina, las células comienzan a acumularse en fase G2-M a las 2 h, alcanzando su pico máximo a las 12 h y comenzando a observar eventos hipodiploides a partir de dicho momento. Comprobaron, además, que dichos eventos eran apoptóticos mediante tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio y por citometría de flujo con anexina V (137). En nuestro caso, observamos este bloqueo desde las 6 h de tratamiento con eribulina en 93T449 y un poco más tarde en CP0024 y en SK-UT-1, obteniendo el máximo a las 12 y 24 h respectivamente, como estaba previamente descrito (150). Además, a tiempos cortos, observamos una acumulación de células en fase S, que no había sido previamente descrita para eribulina. Este efecto es observable en 93T449 a las 3 h y en CP0024 es más evidente a las 6 h. Paralelamente, se observa un incremento en la población hipodiploide subG1, como se describió previamente en cáncer de mama triple negativo con la combinación de eribulina y un inhibidor de la histona deacetilasa (244). Por lo tanto, hay un incremento en la muerte celular que es significativamente diferente entre la eribulina y la combinación tanto en CP0024 como en SK-UT-1 que no se observa en la línea celular 93T449. Esto apoya la idea de que el LMS, tratado con una menor concentración de ambos fármacos, es más sensible a eribulina y que la combinación potencia un incremento en la muerte celular, observado por un incremento de la población subG1, pudiendo ser la causa de la sinergia observada. Se ha descrito que uno de los efectos que provoca eribulina es una parada mitótica irreversible, estudiada a 0 y 10 horas tras la retirada del fármaco y que esta a su vez se acompaña de una fosforilación de Bcl-2 (137, 138). Este efecto también había sido observado en linfomas y variedades de células de cáncer de próstata donde la detención en G2 era irreversible (131). A la concentración y tiempos utilizados en nuestros ensayos, eribulina no parece

causar una parada irreversible de las células en G2-M, aunque experimentos específicos como los nombrados anteriormente serían necesarios para confirmarlo.

La muerte celular causada por eribulina se ha estudiado en líneas celulares de sarcoma de ewing, donde las caspasas contribuyen solo parcialmente a la muerte celular, muerte que se produce con posterioridad a la parada mitótica y que se caracteriza por una inactivación de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y por activación de Bax (142). En rhabdomyosarcoma, Weiß *et al.* observaron la necesidad de que se produzca la parada mitótica para que se induzca la apoptosis y vieron que no solo es dependiente de caspasas, sino que, silenciando asimismo ENDOG (vía independiente de caspasas), igualmente disminuye la apoptosis (141). Kuznetsov *et al.* también estudiaron marcadores apoptóticos como la activación de las caspasas 3 y 9 y el procesamiento de PARP (137). En nuestras líneas de L-sarcomas, se observó un aumento de la apoptosis tanto por citometría de flujo como del procesamiento de PARP-1 y caspasa-3 que explicaría la sinergia observada únicamente en la línea de LPS. En nuestros modelos *in vitro* de LMS, eribulina claramente produce un aumento de la apoptosis mayor que gemcitabina, pero la combinación de ambos no aumenta de manera que sea el causante único de la sinergia que observamos al estudiar la viabilidad celular. Este hecho puede deberse a que otros procesos estén interviniendo en dicha sinergia además de la apoptosis o que dicha apoptosis no sea solamente dependiente de caspasas. Es posible que, al no observar una parada mitótica completa, la célula no esté entrando de lleno en apoptosis y se produzcan procesos alternativos que acaben derivando a las células a su muerte.

Gemcitabina, al ser análogo de la deoxicitidina trifosfato, se incorpora en el ADN de las células durante la replicación, causando un daño en el ADN que la célula no puede reparar, provocando una parada de las células en G1. Decidimos, por tanto, observar si gracias a la combinación obteníamos un mayor daño en ADN que la célula no era capaz de reparar. Son múltiples las evidencias de combinaciones de gemcitabina con otros fármacos como inhibidores de microtúbulos, de PARP o de proteínas como p330. Éstas inducen una sinergia provocada por un aumento de la apoptosis, ligado a un aumento del daño en el ADN, que se mide, en la mayoría de los casos, por un aumento de  $\gamma$ -H2AX (245-247). Dichos estudios fueron realizados tanto en cáncer de páncreas como de pulmón, ya que no existen muchas evidencias en SPB. Asimismo, gemcitabina por sí sola produce un aumento de focos de  $\gamma$ -H2AX en modelos *in vitro* de cáncer de páncreas (248). En nuestra línea de LPS, obtuvimos resultados similares a los publicados ya que la combinación de eribulina y gemcitabina provoca un aumento del número de focos de  $\gamma$ -H2AX por célula, pudiendo justificar la sinergia observada. En



caso de los LMS, claramente eribulina aumenta el número de focos, pero no existe una diferencia significativa con la combinación con gemcitabina. Serían necesarios el análisis de otros marcadores de daño como Rad51 o la fosforilación de ATM y ATR ya que es posible que existan diferencias en los mecanismos de reparación del daño entre las diferentes líneas (245, 249). Sería interesante dilucidar la dependencia de la apoptosis observada de la vía de las caspasas utilizando inhibidores de dicha vía como el inhibidor de pan caspasas Z-VAD(OMe)-FMK, comprobando a su vez si el daño causado al ADN disminuye con esta inhibición.

Estudios previos de nuestro laboratorio observaron el estado de p53 de nuestras células: 93T449 no presenta mutaciones, SK-UT-1 presenta dos mutaciones *missense* en los residuos 524 y 743 y la línea CP0024 presenta una mutación en heterocigosis en el residuo 52. Recientemente se ha demostrado que una pérdida completa de la función de p53 sensibiliza a las células de cáncer de pulmón a eribulina (250) pudiendo ser el caso de nuestras líneas con mutación y pérdida de función de p53, más concretamente de las líneas de LMS. El estado mutacional de 94T778 es desconocido, pero sería de interés determinar si *TP53* está mutado en esta línea de LPS, que es más sensible que la otra línea de este tipo de sarcoma (93T449) a eribulina, o determinar si los niveles de expresión/amplificación de MDM2, un regulador negativo de p53, son superiores en 94T778. Ambas líneas provienen del mismo paciente, pero 94T778 proviene de la segunda metástasis de dicho paciente. En este caso, el estado mutacional/inactivación de p53 podría justificar las diferentes sensibilidades observadas en nuestro contexto preclínico. En línea con esto, fue reportado recientemente que mutaciones en *TP53* están asociadas a una mayor SLP en pacientes con LMS tratados con eribulina (251).

El daño en el ADN y otros tipos de estrés provocan un aumento de la expresión de p21 (252). Además algunos estudios han colocalizado a p21 y  $\gamma$ -H2AX en los sitios de daño ya que se requiere de  $\gamma$ -H2AX para que se induzca la parada del ciclo celular inducida por p21 tras un error en la replicación (253). En nuestras líneas, se induce la expresión de p21 bajo el mismo patrón que  $\gamma$ -H2AX tras el tratamiento con eribulina y gemcitabina. Con todos estos datos, podemos establecer una hipótesis de la serie de procesos que ocurren en nuestras células tras dichos tratamientos: se provoca un daño en el ADN que produce la acumulación de  $\gamma$ -H2AX y p21 que lleva a las células a una parada del ciclo celular que acaba en apoptosis, en parte dependiente de caspasas, como ocurre en los estudios de Weiß *et al.* (141).

Eribulina, además de los mecanismos de acción mencionados anteriormente, tiene la capacidad de efectuar cambios en el microambiente tumoral (146). Decidimos que la

mejor opción para testar nuestra combinación eran modelos PDX en vez de xenoinjertos de líneas celulares ya que dichos PDX representan con una mayor fiabilidad la heterogeneidad tumoral y los procesos biológicos que acaecen en los pacientes (254, 255). Recogimos una información mínima de datos de estos modelos tras su generación, según el consenso recogido por diversos investigadores (256). Estudios clínicos en otros tumores sólidos como cáncer de mama y carcinoma urotelial han demostrado que la combinación de eribulina y gemcitabina es factible y presenta una toxicidad similar a la de otros esquemas. En pacientes con cáncer de mama HER-2 negativo metastásico, esta combinación tiene beneficios clínicos similares a los de gemcitabina más paclitaxel, pero generando una menor neurotoxicidad (156). En carcinoma urotelial, la combinación presentó actividad y fue tolerada en pacientes que no eran elegibles para regímenes basados en cisplatino (257). En SPB, esta combinación se está probando en la Universidad de Yonsei en Corea, en un ensayo clínico abierto de fase II que mide la eficacia de la combinación de eribulina y gemcitabina en L-sarcomas, siendo la SLP el objetivo primario del ensayo (NCT03810976) (223). El tratamiento se lleva a cabo siguiendo el mismo esquema que en nuestra aproximación *in vivo* en PDX. Obtuvimos diferencias pocos significativas entre eribulina y la combinación en ciclos de 21 días de tratamiento, como también observaron Asano *et al.* en xenoinjertos de cáncer de pulmón, ovario y mama con la misma combinación, aunque en su caso aplicaron más de un ciclo de tratamiento (161). Sin embargo, pudimos observar diferencias entre ambos grupos si, tras un ciclo de tratamiento, monitorizamos el crecimiento tumoral hasta un máximo de 150 días tanto en modelos de LMS como de LPS. Encontramos que los tumores tratados con la combinación tardaron más en alcanzar el volumen máximo tumoral que los tratados solamente con eribulina. Sería interesante estudiar los efectos sobre el volumen tumoral y la vasculatura con más de un ciclo de tratamiento con la combinación ya que posiblemente se obtendrían resultados más significativos, pudiendo llegar a alcanzar la respuesta tumoral en estos tumores. Eribulina ha mostrado actividad antitumoral tanto en monoterapia como en combinación con diversos fármacos en 10 xenoinjertos de diferentes tipos de cáncer (143) y ha mostrado superioridad frente a otros fármacos antitumorales para revertir la resistencia a doxorubicina de un xenoinjerto ortotópico de LPS desdiferenciado (153) y en un modelo de sarcoma de ewing (151). También su combinación con un inhibidor de PI3K potencia el efecto antitumoral en PDX de cáncer de mama (258). En todos estos casos las diferencias entre grupos fueron alcanzadas a los pocos días; en el caso de nuestros PDX, los modelos LMS-IBiS-009, LMS-IBiS-010 y LPS-IBiS-15 cursan con un crecimiento lento, teniendo que alargar el ensayo en el tiempo para poder observar las mismas diferencias. Asimismo, sería interesante realizar

un estudio mediante RNA-SEQ de las muestras tumorales para dilucidar cambios entre la monoterapia y la combinación ya que se ha estudiado, mediante esta técnica, que eribulina en combinación con irinotecan activa la vía de señalización de p53 e inhibe a su vez la replicación del ADN (238).

Se ha descrito que la actividad antitumoral de eribulina se basa igualmente en los cambios que produce en el microambiente, principalmente por la respuesta inmune asociada y la remodelación vascular. En xenoinjertos de cáncer de mama, eribulina mejora la perfusión tumoral gracias a un remodelamiento vascular basado en un incremento en el número de pequeños microvasos funcionales (146). En nuestro caso, en el modelo LMS-IBiS-002 obtenemos un resultado similar al de Miki *et al.* (259), en el que el tratamiento con eribulina reduce la MVD. En cambio, en el modelo LMS-IBiS-005 obtenemos el resultado esperado y que más se refleja a lo largo de la literatura (143, 146): el aumento de los microvasos con el tratamiento tanto con eribulina como con la combinación, es decir, eribulina estaría provocando un aumento de los vasos del tumor, permitiendo una mayor perfusión de la droga y un alentecimiento del crecimiento tumoral. Una de las razones por las que no observamos con claridad los resultados esperados en MVD puede deberse a haber realizado este estudio a la finalización del experimento. Para un estudio más fidedigno de los cambios en la densidad de microvasos, se deberían haber extraído los tumores a la semana de tratamiento con fármacos y realizar el estudio en dicho momento, siendo esta una de las limitaciones de nuestro estudio. Funahashi *et al.* estudiaron la perfusión tumoral gracias a la tinción con Hoescht 33342, técnica que sería más adecuada para el estudio de la angiogénesis (146). Asimismo, se debería hacer un estudio de dosis de combinación *in vivo*, testando diferentes concentraciones de eribulina (una inferior y otra superior a la testada) y un análisis de genes de angiogénesis y remodelado vascular para caracterizar los procesos subyacentes a estos cambios. Además de cambios en la angiogénesis, se ha descrito, en la clínica, la implicación de eribulina en el contexto inmune tumoral siendo los linfocitos infiltrantes tumorales un buen marcador del efecto terapéutico de eribulina en cáncer de mama. Se ha observado que la bajada de expresión de TGF- $\beta$  mejora el microambiente inmune tumoral y que los pacientes con lesiones pre-existentes y un alto porcentaje de linfocitos infiltrantes tumorales tratados con eribulina alcanzan un buen pronóstico de la enfermedad (260-263). Por tanto, sería interesante, un estudio, en las muestras tumorales de nuestros PDX, del infiltrado linfocitario y su correlación con la eficacia sobre el crecimiento tumoral. Estos resultados sugieren también que eribulina en combinación con inmunoterapia podría ser una estrategia atractiva en sarcomas.

Otra estrategia de combinación de eribulina es su conjugación con radioterapia, que aumenta la supervivencia de xenoinjertos con glioblastoma. En dicho estudio observaron además que la MVD disminuye con eribulina, sube tras el tratamiento con RT y con la combinación no se ve afectada (259). Recientemente, se ha combinado en modelos *in vitro* 2D y 3D de L-sarcomas con pazopanib o ifosfamida, obteniendo resultados sinérgicos con ambos fármacos (225). Gemcitabina, también en combinación con RT, produce un daño tardío al ADN en vez de en las primeras horas de tratamiento, encontrando en ese punto la sinergia (264). Nuestro grupo ha demostrado la eficacia de la combinación de trabectedina (fármaco que también produce una parada en G2-M) con RT en las 24 horas posteriores al fármaco (40-42). Como eribulina también produce esta parada en G2-M, su combinación con radioterapia o la triple combinación con gemcitabina podrían resultar muy efectivas en SPB. Nuestros resultados podrían corroborarse en otros modelos de LPS y LMS, como aquellos establecidos y caracterizados molecular e histológicamente por Cornillie *et al.* (265).

En general, se comprobó que la combinación es factible y efectiva en modelos de LMS y LPS, sin presentar aparentes toxicidades, observándose un efecto de retraso en el crecimiento del volumen tumoral en los modelos de crecimiento lento y que, además, eribulina por si sola también tiene un gran potencial antitumoral en LPS y LMS, especialmente en tumores con *TP53* mutados.

## **Conclusiones**



1. La proteína MRP-1 muestra un valor predictivo, tanto en supervivencia global como en supervivencia libre de progresión, en pacientes de sarcomas de partes blandas de alto riesgo localizados tratados con antraciclinas más ifosfamida, estableciéndose como una diana terapéutica para revertir la resistencia a dichos fármacos.
2. Nilotinib y avapritinib fueron los inhibidores tirosina quinasa que han demostrado una mayor inhibición de la bomba de eflujo MRP-1, disminuyendo su actividad y, en menor medida, su expresión. Nilotinib y avapritinib se unen al dominio transmembrana de MRP-1 con alta afinidad según el estudio de acoplamiento molecular, siendo esta la posible causa de la inhibición del transportador. La combinación de doxorubicina e ifosfamida con los inhibidores tirosina quinasa nilotinib o avapritinib provocó una bajada de viabilidad celular acompañada de un incremento apoptótico en modelos *in vitro* de SPB debido a la inhibición de MRP-1, como se comprobó a través de la inhibición transitoria de MRP-1 con un ARN pequeño de interferencia.
3. Eribulina es activo en las líneas celulares de L-sarcomas, tanto liposarcoma como leiomiomasarcoma, produciendo un retraso en la fase S a tiempos cortos y una acumulación en G2-M a las 12-24 horas tratamiento. La combinación de eribulina con gemcitabina es sinérgica en modelos *in vitro*, disminuyendo la viabilidad celular, aumentando la población celular subG1 y acumulando daño en el ADN. La combinación secuencial de eribulina previa a gemcitabina puede suponer una nueva estrategia terapéutica en L-sarcomas.
4. La combinación de eribulina y gemcitabina fue viable en modelos *in vivo* de PDX de L-sarcomas, produciéndose un retraso en el crecimiento del volumen tumoral a tiempos largos tras un solo ciclo de tratamiento, siendo este retraso más apreciable en modelos de leiomiomasarcoma. Dicha combinación y eribulina en monoterapia producen cambios en el microambiente tumoral, incrementando la densidad de microvasos.





## **Bibliografía**

1. Hanahan D. The Hallmarks of Cancer Cell. 2000;100:57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
3. (SEOM) SEOM. Las cifras del cáncer en España. 2021.
4. Sbaraglia M, Bellan E, Dei Tos AP. The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives. Pathologica. 2020.
5. Bourcier K, Le Cesne A, Tselikas L, Adam J, Mir O, Honore C, et al. Basic Knowledge in Soft Tissue Sarcoma. Cardiovascular and interventional radiology. 2019;42(9):1255-61.
6. Board WCoTE. Soft tissue and bone tumours. 5th ed  
2020. 607 p.
7. Blay JY, Soibinet P, Penel N, Bompas E, Duffaud F, Stoeckle E, et al. Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients. Ann Oncol. 2017;28(11):2852-9.
8. Thomas DM, Ballinger ML. Etiologic, environmental and inherited risk factors in sarcomas. Journal of surgical oncology. 2015;111(5):490-5.
9. Kallen ME HJ. The 2020 WHO Classification. What's New in Soft Tissue Tumor Pathology? . Am J Surg Pathol. 2021;45:e1-e23.
10. Brennan MF, Antonescu CR, Moraco N, Singer S. Lessons learned from the study of 10,000 patients with soft tissue sarcoma. Ann Surg. 2014;260(3):416-21; discussion 21-2.
11. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018;29(Suppl 4):iv51-iv67.
12. Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. Lancet Oncol. 2009;10(12):1188-98.
13. Martin-Liberal J. Leiomyosarcoma: Principles of management. Intractable & rare diseases research. 2013;2(4):127-9.
14. George S, Serrano C, Hensley ML, Ray-Coquard I. Soft Tissue and Uterine Leiomyosarcoma. J Clin Oncol. 2018;36(2):144-50.
15. Guo X, Jo VY, Mills AM, Zhu SX, Lee CH, Espinosa I, et al. Clinically Relevant Molecular Subtypes in Leiomyosarcoma. Clin Cancer Res. 2015;21(15):3501-11.
16. Bill KL, Casadei L, Prudner BC, Iwenofu H, Strohecker AM, Pollock RE. Liposarcoma: molecular targets and therapeutic implications. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2016;73(19):3711-8.
17. Lee ATJ, Thway K, Huang PH, Jones RL. Clinical and Molecular Spectrum of Liposarcoma. J Clin Oncol. 2018;36(2):151-9.
18. Coindre JM, Pédeutour F, Aurias A. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2010;456(2):167-79.
19. De Vita A, Mercatali L, Recine F, Pieri F, Riva N, Bongiovanni A, et al. Current classification, treatment options, and new perspectives in the management of adipocytic sarcomas. OncoTargets and therapy. 2016;9:6233-46.
20. Suarez-Kelly LP, Baldi GG, Gronchi A. Pharmacotherapy for liposarcoma: current state of the art and emerging systemic treatments. Expert opinion on pharmacotherapy. 2019;20(12):1503-15.
21. Kilpatrick SE, Doyon J, Choong PF, Sim FH, Nascimento AG. The clinicopathologic spectrum of myxoid and round cell liposarcoma. A study of 95 cases. Cancer. 1996;77(8):1450-8.
22. Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, Leung DH, Woodruff JM, Brennan MF, et al. Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. Clin Cancer Res. 2001;7(12):3977-87.

23. ten Heuvel SE, Hoekstra HJ, van Ginkel RJ, Bastiaannet E, Suurmeijer AJ. Clinicopathologic prognostic factors in myxoid liposarcoma: a retrospective study of 49 patients with long-term follow-up. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(1):222-9.
24. Engström K, Willén H, Kåbjörn-Gustafsson C, Andersson C, Olsson M, Göransson M, et al. The myxoid/round cell liposarcoma fusion oncogene FUS-DDIT3 and the normal DDIT3 induce a liposarcoma phenotype in transfected human fibrosarcoma cells. *Am J Pathol*. 2006;168(5):1642-53.
25. Åman P, Dolatabadi S, Svec D, Jonasson E, Safavi S, Andersson D, et al. Regulatory mechanisms, expression levels and proliferation effects of the FUS-DDIT3 fusion oncogene in liposarcoma. *J Pathol*. 2016;238(5):689-99.
26. Gebhard S, Coindre JM, Michels JJ, Terrier P, Bertrand G, Trassard M, et al. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(5):601-16.
27. Gronchi A, Colombo C, Raut CP. Surgical management of localized soft tissue tumors. *Cancer*. 2014;120(17):2638-48.
28. Gannon NP, King DM, Ethun CG, Charlson J, Tran TB, Poultsides G, et al. The role of radiation therapy and margin width in localized soft-tissue sarcoma: Analysis from the US Sarcoma Collaborative. *J Surg Oncol*. 2019;120(3):325-31.
29. Pervaiz N, Colterjohn N, Farrokhyar F, Tozer R, Figueredo A, Ghert M. A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. *Cancer*. 2008;113(3):573-81.
30. Casali PG. Adjuvant chemotherapy for soft tissue sarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e629-33.
31. Gronchi A, Ferrari S, Quagliuolo V, Broto JM, Pousa AL, Grignani G, et al. Histotype-tailored neoadjuvant chemotherapy versus standard chemotherapy in patients with high-risk soft-tissue sarcomas (ISG-ST5 1001): an international, open-label, randomised, controlled, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):812-22.
32. Saponara M, Stacchiotti S, Casali PG, Gronchi A. (Neo)adjuvant treatment in localised soft tissue sarcoma: The unsolved affair. *Eur J Cancer*. 2017;70:1-11.
33. Gronchi A, Palmerini E, Quagliuolo V, Martin Broto J, Lopez Pousa A, Grignani G, et al. Neoadjuvant Chemotherapy in High-Risk Soft Tissue Sarcomas: Final Results of a Randomized Trial From Italian (ISG), Spanish (GEIS), French (FSG), and Polish (PSG) Sarcoma Groups. *J Clin Oncol*. 2020;38(19):2178-86.
34. Rothermundt C, Fischer GF, Bauer S, Blay JY, Grünwald V, Italiano A, et al. Pre- and Postoperative Chemotherapy in Localized Extremity Soft Tissue Sarcoma: A European Organization for Research and Treatment of Cancer Expert Survey. *Oncologist*. 2018;23(4):461-7.
35. Hoefkens F, Dehandschutter C, Somville J, Meijnders P, Van Gestel D. Soft tissue sarcoma of the extremities: pending questions on surgery and radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2016;11(1):136.
36. Judson I, Verweij J, Gelderblom H, Hartmann JT, Schöffski P, Blay JY, et al. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):415-23.
37. Tap WD, Jones RL, Van Tine BA, Chmielowski B, Elias AD, Adkins D, et al. Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial. *Lancet*. 2016;388(10043):488-97.
38. Tap WD, Wagner AJ, Schöffski P, Martin-Broto J, Krarup-Hansen A, Ganjoo KN, et al. Effect of Doxorubicin Plus Olaratumab vs Doxorubicin Plus Placebo on Survival in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcomas: The ANNOUNCE Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2020;323(13):1266-76.

39. Demetri GD, von Mehren M, Jones RL, Hensley ML, Schuetze SM, Staddon A, et al. Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(8):786-93.
40. Gronchi A, Hindi N, Cruz J, Blay JY, Lopez-Pousa A, Italiano A, et al. Trabectedin and RAdiotherapy in Soft Tissue Sarcoma (TRASTS): Results of a Phase I Study in Myxoid Liposarcoma from Spanish (GEIS), Italian (ISG), French (FSG) Sarcoma Groups. *EClinicalMedicine*. 2019;9:35-43.
41. Martin-Broto J, Hindi N, Lopez-Pousa A, Peinado-Serrano J, Alvarez R, Alvarez-Gonzalez A, et al. Assessment of Safety and Efficacy of Combined Trabectedin and Low-Dose Radiotherapy for Patients With Metastatic Soft-Tissue Sarcomas: A Nonrandomized Phase 1/2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(4):535-41.
42. Hindi N, Carrasco García I, Sánchez-Camacho A, Gutierrez A, Peinado J, Rincón I, et al. Trabectedin Plus Radiotherapy for Advanced Soft-Tissue Sarcoma: Experience in Forty Patients Treated at a Sarcoma Reference Center. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12).
43. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379(9829):1879-86.
44. Martin-Broto J, Stacchiotti S, Lopez-Pousa A, Redondo A, Bernabeu D, de Alava E, et al. Pazopanib for treatment of advanced malignant and dedifferentiated solitary fibrous tumour: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(1):134-44.
45. Martin-Broto J, Cruz J, Penel N, Le Cesne A, Hindi N, Luna P, et al. Pazopanib for treatment of typical solitary fibrous tumours: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2020;21(3):456-66.
46. Kollár A, Jones RL, Stacchiotti S, Gelderblom H, Guida M, Grignani G, et al. Pazopanib in advanced vascular sarcomas: an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (STBSG) retrospective analysis. *Acta Oncol*. 2017;56(1):88-92.
47. Stacchiotti S, Ferrari S, Redondo A, Hindi N, Palmerini E, Vaz Salgado MA, et al. Pazopanib for treatment of advanced extraskelatal myxoid chondrosarcoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(9):1252-62.
48. Hirbe AC, Eulo V, Moon CI, Luo J, Myles S, Seetharam M, et al. A phase II study of pazopanib as front-line therapy in patients with non-resectable or metastatic soft-tissue sarcomas who are not candidates for chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2020;137:1-9.
49. Maki RG, Wathen JK, Patel SR, Priebat DA, Okuno SH, Samuels B, et al. Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected]. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2755-63.
50. Pautier P, Floquet A, Penel N, Piperno-Neumann S, Isambert N, Rey A, et al. Randomized multicenter and stratified phase II study of gemcitabine alone versus gemcitabine and docetaxel in patients with metastatic or relapsed leiomyosarcomas: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) French Sarcoma Group Study (TAXOGEM study). *Oncologist*. 2012;17(9):1213-20.
51. Seddon B, Strauss SJ, Whelan J, Leahy M, Woll PJ, Cowie F, et al. Gemcitabine and docetaxel versus doxorubicin as first-line treatment in previously untreated advanced unresectable or metastatic soft-tissue sarcomas (GeDDiS): a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(10):1397-410.
52. Losa R, Fra J, López-Pousa A, Sierra M, Goitia A, Uña E, et al. Phase II study with the combination of gemcitabine and DTIC in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59(2):251-9.
53. Garcia-Del-Muro X, Lopez-Pousa A, Maurel J, Martin J, Martinez-Trufero J, Casado A, et al. Randomized phase II study comparing gemcitabine plus dacarbazine versus dacarbazine

alone in patients with previously treated soft tissue sarcoma: a Spanish Group for Research on Sarcomas study. *J Clin Oncol.* 2011;29(18):2528-33.

54. Patel S, von Mehren M, Reed DR, Kaiser P, Charlson J, Ryan CW, et al. Overall survival and histology-specific subgroup analyses from a phase 3, randomized controlled study of trabectedin or dacarbazine in patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma. *Cancer.* 2019;125(15):2610-20.

55. Brodowicz T, Liegl-Atzwager B, Tresch E, Taieb S, Kramar A, Gruenwald V, et al. Study protocol of REGOSARC trial: activity and safety of regorafenib in advanced soft tissue sarcoma: a multinational, randomized, placebo-controlled, phase II trial. *BMC Cancer.* 2015;15:127.

56. Penel N, Mir O, Wallet J, Ray-Coquard I, Le Cesne A, Italiano A, et al. A double-blind placebo-controlled randomized phase II trial assessing the activity and safety of regorafenib in non-adipocytic sarcoma patients previously treated with both chemotherapy and pazopanib. *Eur J Cancer.* 2020;126:45-55.

57. Schöffski P, Chawla S, Maki RG, Italiano A, Gelderblom H, Choy E, et al. Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet.* 2016;387(10028):1629-37.

58. Lipinski KA, Barber LJ, Davies MN, Ashenden M, Sottoriva A, Gerlinger M. Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends in cancer.* 2016;2(1):49-63.

59. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews Cancer.* 2013;13(10):714-26.

60. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(16):1295-302.

61. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 2008;9(1):105-27.

62. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology.* 2004;11(10):918-26.

63. Pasello M, Giudice AM, Scotlandi K. The ABC subfamily A transporters: Multifaceted players with incipient potentialities in cancer. *Seminars in cancer biology.* 2020;60:57-71.

64. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* 2009;3(3):281-90.

65. Wang JQ, Wu ZX, Yang Y, Teng QX, Li YD, Lei ZN, et al. ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer: A review of recent updates. *J Evid Based Med.* 2021;14(3):232-56.

66. Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics.* 2005;6:123-42.

67. Marquez B, Van Bambeke F. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Current drug targets.* 2011;12(5):600-20.

68. Johnson ZL, Chen J. Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell.* 2017;168(6):1075-85.e9.

69. Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol.* 1996;148(4):1237-47.

70. Jaramillo AC, Saig FA, Cloos J, Jansen G, Peters GJ. How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resistance.* 2018;1(1):6-29.

71. Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol.* 2011(201):261-83.

72. Cole SP. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:95-117.

73. Strouse JJ, Ivnitski-Steele I, Waller A, Young SM, Perez D, Evangelisti AM, et al. Fluorescent substrates for flow cytometric evaluation of efflux inhibition in ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporters. *Analytical biochemistry.* 2013;437(1):77-87.

74. Komdeur R, Plaat BE, van der Graaf WT, Hoekstra HJ, Hollema H, van den Berg E, et al. Expression of multidrug resistance proteins, P-gp, MRP1 and LRP, in soft tissue sarcomas analysed according to their histological type and grade. *Eur J Cancer*. 2003;39(7):909-16.
75. Oda Y, Saito T, Tateishi N, Ohishi Y, Tamiya S, Yamamoto H, et al. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human soft tissue sarcomas. *International journal of cancer*. 2005;114(6):854-62.
76. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Bròdano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G, et al. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *The New England journal of medicine*. 1995;333(21):1380-5.
77. Susa M, Iyer AK, Ryu K, Choy E, Hornicek FJ, Mankin H, et al. Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. *PloS one*. 2010;5(5):e10764.
78. Liu T, Li Z, Zhang Q, De Amorim Bernstein K, Lozano-Calderon S, Choy E, et al. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget*. 2016;7(50):83502-13.
79. Roundhill EA, Jabri S, Burchill SA. ABCG1 and Pgp identify drug resistant, self-renewing osteosarcoma cells. *Cancer Lett*. 2019;453:142-57.
80. Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *The Journal of pathology*. 2002;198(2):213-9.
81. Citti A, Boldrini R, Inserra A, Alisi A, Pessolano R, Mastronuzzi A, et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins in paediatric soft tissue sarcomas before and after chemotherapy. *Int J Oncol*. 2012;41(1):117-24.
82. Roundhill E, Burchill S. Membrane expression of MRP-1, but not MRP-1 splicing or Pgp expression, predicts survival in patients with ESFT. *Br J Cancer*. 2013;109(1):195-206.
83. Théou N, Gil S, Devocelle A, Julié C, Lavergne-Slove A, Beauchet A, et al. Multidrug resistance proteins in gastrointestinal stromal tumors: site-dependent expression and initial response to imatinib. *Clin Cancer Res*. 2005;11(21):7593-8.
84. Martin-Broto J, Gutierrez AM, Ramos RF, Lopez-Guerrero JA, Ferrari S, Stacchiotti S, et al. MRP1 overexpression determines poor prognosis in prospectively treated patients with localized high-risk soft tissue sarcoma of limbs and trunk wall: an ISG/GEIS study. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(1):249-59.
85. Stefan SM, Wiese M. Small-molecule inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1 and related processes: A historic approach and recent advances. *Med Res Rev*. 2019;39(1):176-264.
86. Cole SPC, Downes HF, Slovak ML. Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug-resistant human tumour cell lines which do not overexpress P-glycoprotein. *British Journal of Cancer*. 1989;59(1):42-6.
87. Shudo N, Mizoguchi T, Kiyosue T, Arita M, Yoshimura A, Seto K, et al. Two pyridine analogues with more effective ability to reverse multidrug resistance and with lower calcium channel blocking activity than their dihydropyridine counterparts. *Cancer research*. 1990;50(10):3055-61.
88. Abe T, Koike K, Ohga T, Kubo T, Wada M, Kohno K, et al. Chemosensitisation of spontaneous multidrug resistance by a 1,4-dihydropyridine analogue and verapamil in human glioma cell lines overexpressing MRP or MDR1. *British Journal of Cancer*. 1995;72(2):418-23.
89. Vanhoefer U, Cao S, Minderman H, Tóth K, Scheper RJ, Slovak ML, et al. PAK-104P, a pyridine analogue, reverses paclitaxel and doxorubicin resistance in cell lines and nude mice bearing xenografts that overexpress the multidrug resistance protein. *Clin Cancer Res*. 1996;2(2):369-77.

90. Chuman Y, Chen ZS, Seto K, Sumizawa T, Furukawa T, Tani A, et al. Reversal of MRP-mediated vincristine resistance in KB cells by buthionine sulfoximine in combination with PAK-104P. *Cancer Lett.* 1998;129(1):69-76.
91. Minderman H, O'Loughlin KL, Pendyala L, Baer MR. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin Cancer Res.* 2004;10(5):1826-34.
92. Bramwell VH, Morris D, Ernst DS, Hings I, Blackstein M, Venner PM, et al. Safety and efficacy of the multidrug-resistance inhibitor biricodar (VX-710) with concurrent doxorubicin in patients with anthracycline-resistant advanced soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2002;8(2):383-93.
93. Versantvoort CH, Bagrij T, Wright KA, Twentyman PR. On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP). *International journal of cancer.* 1995;63(6):855-62.
94. Lam BK, Xu K, Atkins MB, Austen KF. Leukotriene C4 uses a probenecid-sensitive export carrier that does not recognize leukotriene B4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(23):11598-602.
95. Gollapudi S, Kim CH, Tran BN, Sangha S, Gupta S. Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40(2):150-8.
96. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Keppler D. Characterization of the ATP-dependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. *Eur J Biochem.* 1994;220(2):599-606.
97. Okada T, Tanaka K, Nakatani F, Sakimura R, Matsunobu T, Li X, et al. Involvement of P-glycoprotein and MRP1 in resistance to cyclic tetrapeptide subfamily of histone deacetylase inhibitors in the drug-resistant osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer.* 2006;118(1):90-7.
98. Villar VH, Vögler O, Barceló F, Gómez-Florit M, Martínez-Serra J, Obrador-Hevia A, et al. Oleonic and maslinic acid sensitize soft tissue sarcoma cells to doxorubicin by inhibiting the multidrug resistance protein MRP-1, but not P-glycoprotein. *J Nutr Biochem.* 2014;25(4):429-38.
99. Fanelli M, Hattinger CM, Vella S, Tavanti E, Michelacci F, Gudeman B, et al. Targeting ABCB1 and ABCC1 with their Specific Inhibitor CBT-1<sup>®</sup> can Overcome Drug Resistance in Osteosarcoma. *Current cancer drug targets.* 2016;16(3):261-74.
100. Beretta GL, Cassinelli G, Pennati M, Zuco V, Gatti L. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European journal of medicinal chemistry.* 2017;142:271-89.
101. Krchniakova M, Skoda J, Neradil J, Chlapek P, Veselska R. Repurposing Tyrosine Kinase Inhibitors to Overcome Multidrug Resistance in Cancer: A Focus on Transporters and Lysosomal Sequestration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).
102. Kitazaki T, Oka M, Nakamura Y, Tsurutani J, Doi S, Yasunaga M, et al. Gefitinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, directly inhibits the function of P-glycoprotein in multidrug resistant cancer cells. *Lung Cancer.* 2005;49(3):337-43.
103. Tiwari AK, Sodani K, Dai CL, Abuznait AH, Singh S, Xiao ZJ, et al. Nilotinib potentiates anticancer drug sensitivity in murine ABCB1-, ABCG2-, and ABCC10-multidrug resistance xenograft models. *Cancer Lett.* 2013;328(2):307-17.
104. Zhang H, Kathawala RJ, Wang YJ, Zhang YK, Patel A, Shukla S, et al. Linsitinib (OSI-906) antagonizes ATP-binding cassette subfamily G member 2 and subfamily C member 10-mediated drug resistance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;51:111-9.
105. Poveda A, García Del Muro X, López-Guerrero JA, Cubedo R, Martínez V, Romero I, et al. GEIS guidelines for gastrointestinal sarcomas (GIST). *Cancer Treat Rev.* 2017;55:107-19.

106. Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, Váradi A, Sarkadi B, Kéri G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1587(2-3):318-25.
107. Dharmapuri G, Doneti R, Philip GH, Kalle AM. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways. *Leukemia research*. 2015;39(7):696-701.
108. Villar VH, Vögler O, Martínez-Serra J, Ramos R, Calabuig-Fariñas S, Gutiérrez A, et al. Nilotinib counteracts P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and synergizes the antitumoral effect of doxorubicin in soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2012;7(5):e37735.
109. Alemany R, Moura DS, Redondo A, Martínez-Trufero J, Calabuig S, Saus C, et al. Nilotinib as Coadjuvant Treatment with Doxorubicin in Patients with Sarcomas: A Phase I Trial of the Spanish Group for Research on Sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(21):5239-49.
110. Tiwari AK, Sodani K, Wang SR, Kuang YH, Ashby CR, Jr., Chen X, et al. Nilotinib (AMN107, Tasisa) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(2):153-61.
111. Martin-Broto J, Moura DS. New drugs in gastrointestinal stromal tumors. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(4):314-20.
112. Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, et al. Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2007;13(5):1576-83.
113. Lin S, Hoffmann K, Xiao Z, Jin N, Galli U, Mohr E, et al. MEK inhibition induced downregulation of MRP1 and MRP3 expression in experimental hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):3.
114. Wu CP, Lusvardi S, Wang JC, Hsiao SH, Huang YH, Hung TH, et al. Avapritinib: A Selective Inhibitor of KIT and PDGFR $\alpha$  that Reverses ABCB1 and ABCG2-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cell Lines. *Mol Pharm*. 2019;16(7):3040-52.
115. Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, Blum JL, Vahdat LT, Petrakova K, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet*. 2011;377(9769):914-23.
116. Osgood CL, Chuk MK, Theoret MR, Huang L, He K, Her L, et al. FDA Approval Summary: Eribulin for Patients with Unresectable or Metastatic Liposarcoma Who Have Received a Prior Anthracycline-Containing Regimen. *Clin Cancer Res*. 2017;23(21):6384-9.
117. Aicher TD, Buszek KR, Fang FG, Forsyth CJ, Jung SH, Kishi Y, et al. Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B. *Journal of the American Chemical Society*. 1992;114(8):3162-4.
118. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Veterinary pathology*. 1998;35(6):461-78.
119. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. [Hauptbd.]. [Hauptbd.]. New York, NY [u.a.]: Garland Science Taylor & Francis; 2008.
120. Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*. 1999;18(55):7883-99.
121. Mitchison TJ, Salmon ED. Mitosis: a history of division. *Nature cell biology*. 2001;3(1):E17-21.
122. Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(6).
123. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):316-23.
124. Petsalaki E, Zachos G. DNA damage response proteins regulating mitotic cell division: double agents preserving genome stability. *The FEBS journal*. 2020;287(9):1700-21.
125. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):512-22.
126. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475-85.



127. Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene*. 2001;20(40):5572-9.
128. Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001;410(6830):842-7.
129. Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):997-1007.
130. Goodman SR, Elsevier. *Medical cell biology*. Amsterdam [i pozostale]: Elsevier/Academic Press; 2019.
131. Towle MJ, Salvato KA, Budrow J, Wels BF, Kuznetsov G, Aalfs KK, et al. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer research*. 2001;61(3):1013-21.
132. Jordan MA, Kamath K, Manna T, Okouneva T, Miller HP, Davis C, et al. The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(7):1086-95.
133. Maki RG. Eribulin in soft-tissue sarcomas. *The Lancet Oncology*. 2011;12(11):988-9.
134. Smith JA, Wilson L, Azarenko O, Zhu X, Lewis BM, Littlefield BA, et al. Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry*. 2010;49(6):1331-7.
135. Bai R, Nguyen TL, Burnett JC, Atasoylu O, Munro MH, Pettit GR, et al. Interactions of halichondrin B and eribulin with tubulin. *Journal of chemical information and modeling*. 2011;51(6):1393-404.
136. Okouneva T, Azarenko O, Wilson L, Littlefield BA, Jordan MA. Inhibition of centromere dynamics by eribulin (E7389) during mitotic metaphase. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(7):2003-11.
137. Kuznetsov G, Towle MJ, Cheng H, Kawamura T, TenDyke K, Liu D, et al. Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389. *Cancer Res*. 2004;64(16):5760-6.
138. Towle MJ, Salvato KA, Wels BF, Aalfs KK, Zheng W, Seletsky BM, et al. Eribulin induces irreversible mitotic blockade: implications of cell-based pharmacodynamics for in vivo efficacy under intermittent dosing conditions. *Cancer Res*. 2011;71(2):496-505.
139. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
140. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
141. Weiß LM, Hugle M, Romero S, Fulda S. Synergistic induction of apoptosis by a polo-like kinase 1 inhibitor and microtubule-interfering drugs in Ewing sarcoma cells. *Int J Cancer*. 2016;138(2):497-506.
142. Weiß LM, Hugle M, Fulda S. Eribulin alone or in combination with the PLK1 inhibitor BI 6727 triggers intrinsic apoptosis in Ewing sarcoma cell lines. *Oncotarget*. 2017;8(32):52445-56.
143. Ito K, Hamamichi S, Abe T, Akagi T, Shirota H, Kawano S, et al. Antitumor effects of eribulin depend on modulation of the tumor microenvironment by vascular remodeling in mouse models. *Cancer Sci*. 2017;108(11):2273-80.
144. Agoulnik SI, Kawano S, Taylor N, Oestreicher J, Matsui J, Chow J, et al. Eribulin mesylate exerts specific gene expression changes in pericytes and shortens pericyte-driven capillary network in vitro. *Vascular cell*. 2014;6(1):3.
145. Dybdal-Hargreaves NF, Risinger AL, Mooberry SL. Eribulin mesylate: mechanism of action of a unique microtubule-targeting agent. *Clin Cancer Res*. 2015;21(11):2445-52.
146. Funahashi Y, Okamoto K, Adachi Y, Semba T, Uesugi M, Ozawa Y, et al. Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Cancer Sci*. 2014;105(10):1334-42.
147. Kawano S, Asano M, Adachi Y, Matsui J. Antimitotic and Non-mitotic Effects of Eribulin Mesilate in Soft Tissue Sarcoma. *Anticancer Res*. 2016;36(4):1553-61.

148. Dezső Z, Oestreicher J, Weaver A, Santiago S, Agoulnik S, Chow J, et al. Gene expression profiling reveals epithelial mesenchymal transition (EMT) genes can selectively differentiate eribulin sensitive breast cancer cells. *PloS one*. 2014;9(8):e106131.
149. Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, et al. Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1497-505.
150. Nakai S, Tamiya H, Imura Y, Nakai T, Yasuda N, Wakamatsu T, et al. Eribulin Suppresses Clear Cell Sarcoma Growth by Inhibiting Cell Proliferation and Inducing Melanocytic Differentiation Both Directly and Via Vascular Remodeling. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(3):742-54.
151. Miyake K, Murakami T, Kiyuna T, Igarashi K, Kawaguchi K, Li Y, et al. Eribulin regresses a doxorubicin-resistant Ewing's sarcoma with a FUS-ERG fusion and CDKN2A-deletion in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse model. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):967-72.
152. Kiyuna T, Tome Y, Miyake K, Murakami T, Oshiro H, Igarashi K, et al. Eribulin Suppressed Cisplatin- and Doxorubicin-resistant Recurrent Lung Metastatic Osteosarcoma in a Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Model. *Anticancer Res*. 2019;39(9):4775-9.
153. Igarashi K, Kawaguchi K, Kiyuna T, Miyake K, Higuchi T, Yamamoto N, et al. Eribulin Regresses a Doxorubicin-resistant Dedifferentiated Liposarcoma in a Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Model. *Cancer Genomics Proteomics*. 2020;17(4):351-8.
154. Ueda S, Saeki T, Takeuchi H, Shigekawa T, Yamane T, Kuji I, et al. In vivo imaging of eribulin-induced reoxygenation in advanced breast cancer patients: a comparison to bevacizumab. *Br J Cancer*. 2016;114(11):1212-8.
155. Kaufman PA, Awada A, Twelves C, Yelle L, Perez EA, Velikova G, et al. Phase III open-label randomized study of eribulin mesylate versus capecitabine in patients with locally advanced or metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(6):594-601.
156. Park YH, Im SA, Kim SB, Sohn JH, Lee KS, Chae YS, et al. Phase II, multicentre, randomised trial of eribulin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line chemotherapy in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2017;86:385-93.
157. Perez-Garcia JM, Cortes J. The safety of eribulin for the treatment of metastatic breast cancer. *Expert opinion on drug safety*. 2019;18(5):347-55.
158. Demetri GD, Schöffski P, Grignani G, Blay JY, Maki RG, Van Tine BA, et al. Activity of Eribulin in Patients With Advanced Liposarcoma Demonstrated in a Subgroup Analysis From a Randomized Phase III Study of Eribulin Versus Dacarbazine. *J Clin Oncol*. 2017;35(30):3433-9.
159. Blay JY, Schoffski P, Bauer S, Krarup-Hansen A, Benson C, D'Adamo DR, et al. Eribulin versus dacarbazine in patients with leiomyosarcoma: subgroup analysis from a phase 3, open-label, randomised study. *Br J Cancer*. 2019;120(11):1026-32.
160. Grignani G, D'Ambrosio L. Eribulin-based treatment in patients affected by sarcomas: a case series. *Future oncology (London, England)*. 2020;16(1s):1-3.
161. Asano M, Matsui J, Towle MJ, Wu J, McGonigle S, MH DEB, et al. Broad-spectrum Preclinical Antitumor Activity of Eribulin (Halaven(R)): Combination with Anticancer Agents of Differing Mechanisms. *Anticancer Res*. 2018;38(6):3375-85.
162. Moysan E, Bastiat G, Benoit JP. Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: a review of several promising chemical modifications. *Mol Pharm*. 2013;10(2):430-44.
163. Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs*. 1995;6 Suppl 6:7-13.
164. Seddon B, Scurr M, Jones RL, Wood Z, Propert-Lewis C, Fisher C, et al. A phase II trial to assess the activity of gemcitabine and docetaxel as first line chemotherapy treatment in patients with unresectable leiomyosarcoma. *Clin Sarcoma Res*. 2015;5:13.

165. Sonnenblick A, Eleyan F, Peretz T, Ospovat I, Merimsky O, Sella T, et al. Gemcitabine in combination with paclitaxel for advanced soft-tissue sarcomas. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(4):829-32.
166. Martin-Liberal J, Lopez-Pousa A, Martinez-Trufero J, Martin-Broto J, Cubedo R, Lavernia J, et al. Phase II Study of Gemcitabine Plus Sirolimus in Previously Treated Patients with Advanced Soft-Tissue Sarcoma: a Spanish Group for Research on Sarcomas (GEIS) Study. *Target Oncol*. 2018;13(1):81-7.
167. Somaiah N, Van Tine BA, Wahlquist AE, Milhem MM, Hill EG, Garrett-Mayer E, et al. A randomized, open-label, phase 2, multicenter trial of gemcitabine with pazopanib or gemcitabine with docetaxel in patients with advanced soft-tissue sarcoma. *Cancer*. 2021;127(6):894-904.
168. Dickson MA, D'Adamo DR, Keohan ML, D'Angelo SP, Carvajal RD, Gounder MM, et al. Phase II Trial of Gemcitabine and Docetaxel with Bevacizumab in Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma*. 2015;2015:532478.
169. Hensley ML, Miller A, O'Malley DM, Mannel RS, Behbakht K, Bakkum-Gamez JN, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus docetaxel plus bevacizumab or placebo as first-line treatment for metastatic uterine leiomyosarcoma: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2015;33(10):1180-5.
170. Tao H, Chen F, Liu H, Hu Y, Wang Y, Li H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation reverses gemcitabine resistance by attenuating Beclin1-mediated autophagy in the MG63 human osteosarcoma cell line. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):1701-6.
171. Wang S, Wei H, Huang Z, Wang X, Shen R, Wu Z, et al. Epidermal growth factor receptor promotes tumor progression and contributes to gemcitabine resistance in osteosarcoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021;53(3):317-24.
172. Laroche-Clary A, Lucchesi C, Rey C, Verbeke S, Bourdon A, Chaire V, et al. CHK1 inhibition in soft-tissue sarcomas: biological and clinical implications. *Ann Oncol*. 2018;29(4):1023-9.
173. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82.
174. Clark TG, Altman DG, De Stavola BL. Quantification of the completeness of follow-up. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9314):1309-10.
175. Holland IB, Blight MA. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol*. 1999;293(2):381-99.
176. Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol*. 1999;48(1):22-41.
177. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, et al. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002;58(Pt 6 No 1):899-907.
178. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296-w303.
179. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-91.
180. Tanchuk VY, Tanin VO, Vovk AI, Poda G. A New Scoring Function for Molecular Docking Based on AutoDock and AutoDock Vina. *Curr Drug Discov Technol*. 2015;12(3):170-8.
181. Jiménez J, Škalič M, Martínez-Rosell G, De Fabritiis G. K(DEEP): Protein-Ligand Absolute Binding Affinity Prediction via 3D-Convolutional Neural Networks. *J Chem Inf Model*. 2018;58(2):287-96.
182. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*. 2011;3:33.

183. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012;4(1):17.
184. Assaraf YG, Brozovic A, Gonçalves AC, Jurkovicova D, Linē A, Machuqueiro M, et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* 2019;46:100645.
185. Gronchi A, Frustaci S, Mercuri M, Martin J, Lopez-Pousa A, Verderio P, et al. Short, full-dose adjuvant chemotherapy in high-risk adult soft tissue sarcomas: a randomized clinical trial from the Italian Sarcoma Group and the Spanish Sarcoma Group. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):850-6.
186. Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(8):438-46.
187. Lu JF, Pokharel D, Bebawy M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metab Rev.* 2015;47(4):406-19.
188. He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem.* 2011;18(3):439-81.
189. Jimenez RE, Zalupski MM, Frank JJ, Du W, Ryan JR, Lucas DR. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. *Cancer.* 1999;86(6):976-81.
190. Coley HM, Verrill MW, Gregson SE, Odell DE, Fisher C, Judson IR. Incidence of P-glycoprotein overexpression and multidrug resistance (MDR) reversal in adult soft tissue sarcoma. *Eur J Cancer.* 2000;36(7):881-8.
191. Lu QJ, Dong F, Zhang JH, Li XH, Ma Y, Jiang WG. Expression of multidrug resistance-related markers in primary neuroblastoma. *Chin Med J (Engl).* 2004;117(9):1358-63.
192. Haber M, Smith J, Bordow SB, Flemming C, Cohn SL, London WB, et al. Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(10):1546-53.
193. Alisi A, Cho WC, Locatelli F, Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *Int J Mol Sci.* 2013;14(12):24706-25.
194. Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005;11(24 Pt 1):8661-8.
195. Li J, Li ZN, Yu LC, Bao QL, Wu JR, Shi SB, et al. Association of expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 with outcome of patients with locally advanced non-small cell lung cancer who received neoadjuvant chemotherapy. *Lung Cancer.* 2010;69(1):116-22.
196. Filipits M, Pohl G, Rudas M, Dietze O, Lax S, Grill R, et al. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 2005;23(6):1161-8.
197. Ogura K, Hosoda F, Arai Y, Nakamura H, Hama N, Totoki Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of myxofibrosarcoma. *Nat Commun.* 2018;9(1):2765.
198. Sobczuk P, Teterycz P, Czarnecka AM, Świtaj T, Koseła-Paterczyk H, Kozak K, et al. Systemic Treatment for Advanced and Metastatic Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors-A Sarcoma Reference Center Experience. *J Clin Med.* 2020;9(10).
199. Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, Robey RW, Volkmann T, Deeken JF, et al. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2010;38(8):1371-80.
200. Dhillon S. Avapritinib: First Approval. *Drugs.* 2020;80(4):433-9.
201. Heinrich MC, Jones RL, von Mehren M, Schöffski P, Serrano C, Kang YK, et al. Avapritinib in advanced PDGFRA D842V-mutant gastrointestinal stromal tumour (NAVIGATOR): a multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(7):935-46.

202. El Azreq MA, Naci D, Aoudjit F. Collagen/ $\beta$ 1 integrin signaling up-regulates the ABCB1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Mol Biol Cell*. 2012;23(17):3473-84.
203. Tomiyasu H, Watanabe M, Sugita K, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, et al. Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Anticancer Res*. 2013;33(12):5317-23.
204. Gupta A, Singh J, García-Valverde A, Serrano C, Flynn DL, Smith BD. Ripretinib and MEK Inhibitors Synergize to Induce Apoptosis in Preclinical Models of GIST and Systemic Mastocytosis. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(7):1234-45.
205. Sirisha K, Shekhar MC, Umasankar K, Mahendar P, Sadanandam A, Achaiah G, et al. Molecular docking studies and in vitro screening of new dihydropyridine derivatives as human MRP1 inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(10):3249-54.
206. Sreenivasan S, Ravichandran S, Vetrivel U, Krishnakumar S. In vitro and In silico studies on inhibitory effects of curcumin on multi drug resistance associated protein (MRP1) in retinoblastoma cells. *Bioinformation*. 2012;8(1):13-9.
207. Dhasmana D, Singh A, Shukla R, Tripathi T, Garg N. Targeting Nucleotide Binding Domain of Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP1) for the Reversal of Multi Drug Resistance in Cancer. *Sci Rep*. 2018;8(1):11973.
208. Gupta P, Zhang YK, Zhang XY, Wang YJ, Lu KW, Hall T, et al. Voruciclib, a Potent CDK4/6 Inhibitor, Antagonizes ABCB1 and ABCG2-Mediated Multi-Drug Resistance in Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(4):1515-28.
209. Rodríguez-Chávez JL, Méndez-Cuesta CA, Ramírez-Apan T, Egas V, Ávila JL, Neira-González A, et al. Chemo-sensitizing activity of natural cadinanes from *Heterotheca inuloides* in human uterine sarcoma cells and their in silico interaction with ABC transporters. *Bioorg Chem*. 2019;91:103091.
210. Fan YF, Zhang W, Zeng L, Lei ZN, Cai CY, Gupta P, et al. Dacomitinib antagonizes multidrug resistance (MDR) in cancer cells by inhibiting the efflux activity of ABCB1 and ABCG2 transporters. *Cancer Lett*. 2018;421:186-98.
211. Zhang H, Patel A, Ma SL, Li XJ, Zhang YK, Yang PQ, et al. In vitro, in vivo and ex vivo characterization of ibrutinib: a potent inhibitor of the efflux function of the transporter MRP1. *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5845-57.
212. Cui TY, Chen BA, Ding JH, Gao C, Cheng J, Bao W, et al. [Inducing apoptosis and reversal effect of nilotinib in combination with tetrandrine on multidrug resistance of K562/A02 cell line]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011;19(1):28-33.
213. Kim JY, Kim HS, Yoon S. Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib and Erlotinib Increase Apoptosis of Antimitotic Drug-resistant KBV20C Cells Without Inhibiting P-gp. *Anticancer Res*. 2019;39(7):3785-93.
214. Kim KS, Jiang C, Kim JY, Park JH, Kim HR, Lee SH, et al. Low-Dose Crizotinib, a Tyrosine Kinase Inhibitor, Highly and Specifically Sensitizes P-Glycoprotein-Overexpressing Chemoresistant Cancer Cells Through Induction of Late Apoptosis in vivo and in vitro. *Frontiers in Oncology*. 2020;10(696).
215. Hiwase DK, White D, Zrim S, Saunders V, Melo JV, Hughes TP. Nilotinib-mediated inhibition of ABCB1 increases intracellular concentration of dasatinib in CML cells: implications for combination TKI therapy. *Leukemia*. 2010;24(3):658-60.
216. D'Cunha RR, Murry DJ, An G. Nilotinib Alters the Efflux Transporter-Mediated Pharmacokinetics of Afatinib in Mice. *J Pharm Sci*. 2019;108(10):3434-42.
217. Zhou ZY, Wan LL, Yang QJ, Han YL, Li D, Lu J, et al. Nilotinib reverses ABCB1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance but increases cardiotoxicity of doxorubicin in a MDR xenograft model. *Toxicol Lett*. 2016;259:124-32.
218. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 2001;98(12):3212-20.

219. Millward MJ, Cantwell BM, Munro NC, Robinson A, Corris PA, Harris AL. Oral verapamil with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a randomised study. *Br J Cancer*. 1993;67(5):1031-5.
220. Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, Facchini T, Goudier MJ, Krakowski I, et al. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol*. 2000;11(11):1471-6.
221. Jones RL, Serrano C, von Mehren M, George S, Heinrich MC, Kang YK, et al. Avapritinib in unresectable or metastatic PDGFRA D842V-mutant gastrointestinal stromal tumours: Long-term efficacy and safety data from the NAVIGATOR phase I trial. *Eur J Cancer*. 2021;145:132-42.
222. Schöffski P, Ray-Coquard IL, Cioffi A, Bui NB, Bauer S, Hartmann JT, et al. Activity of eribulin mesylate in patients with soft-tissue sarcoma: a phase 2 study in four independent histological subtypes. *The Lancet Oncology*. 2011;12(11):1045-52.
223. Hayasaka N, Takada K, Nakamura H, Arihara Y, Kawano Y, Osuga T, et al. Combination of eribulin plus AKT inhibitor evokes synergistic cytotoxicity in soft tissue sarcoma cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):5759.
224. Stehle A, Hugel M, Fulda S. Eribulin synergizes with Polo-like kinase 1 inhibitors to induce apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett*. 2015;365(1):37-46.
225. Escudero J, Heredia-Soto V, Wang Y, Ruiz P, Hu Y, Gallego A, et al. Eribulin activity in soft tissue sarcoma monolayer and three-dimensional cell line models: could the combination with other drugs improve its antitumoral effect? *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):646.
226. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020;577(7791):556-60.
227. Tolaney SM, Barroso-Sousa R, Keenan T, Li T, Trippa L, Vaz-Luis I, et al. Effect of Eribulin With or Without Pembrolizumab on Progression-Free Survival for Patients With Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(10):1598-605.
228. Araki K, Fukada I, Yanagi H, Kobayashi K, Shibayama T, Horii R, et al. First report of eribulin in combination with pertuzumab and trastuzumab for advanced HER2-positive breast cancer. *Breast*. 2017;35:78-84.
229. Tono Y, Ishihara M, Miyahara Y, Tamaru S, Oda H, Yamashita Y, et al. Pertuzumab, trastuzumab and eribulin mesylate therapy for previously treated advanced HER2-positive breast cancer: a feasibility study with analysis of biomarkers. *Oncotarget*. 2018;9(19):14909-21.
230. Sarici F, Altundag K. Efficacy and safety evaluation of eribulin-trastuzumab combination therapy with heavily pretreated HER2-positive metastatic breast cancer. *J buon*. 2020;25(6):2562-9.
231. Balch SM, Vaz-Luis I, Li T, Tayob N, Jain E, Helvie K, et al. A phase II study of efficacy, toxicity, and the potential impact of genomic alterations on response to eribulin mesylate in combination with trastuzumab and pertuzumab in women with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)+ metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;189(2):411-23.
232. Yamashita T, Kawaguchi H, Masuda N, Kitada M, Narui K, Hattori M, et al. Efficacy of the eribulin, pertuzumab, and trastuzumab combination therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced or metastatic breast cancer: a multicenter, single arm, phase II study (JBCRG-M03 study). *Invest New Drugs*. 2021;39(1):217-25.
233. Lutrino ES, Orlando L, Febbraro A, Giampaglia M, Zamagni C, Schiavone P, et al. Eribulin plus trastuzumab in pretreated HER2-positive advanced breast cancer patients: safety and efficacy. An Italian experience. *Tumori*. 2020;106(4):301-5.
234. Sakaguchi K, Nakatsukasa K, Koyama H, Kato M, Sakuyama A, Matsuda T, et al. Phase II Clinical Trial of First-line Eribulin Plus Trastuzumab for Advanced or Recurrent HER2-positive Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2018;38(7):4073-81.

235. Kondo N, Kashiwaba M, Goto R, Hattori M, Iwata H. [A Phase I Combination Dose-Escalation Study of Eribulin Mesylate and Gemcitabine in Japanese Patients with Metastatic Breast Cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2018;45(8):1165-70.
236. Park YH, Im SA, Kim SB, Sohn JH, Lee KS, Chae YS, et al. Phase II, multicentre, randomised trial of eribulin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line chemotherapy in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2017;86:385-93.
237. Lheureux S, Oza AM, Laurie SA, Halford R, Jonker D, Chen E, et al. A phase I combination dose-escalation study of eribulin mesylate and gemcitabine in patients with advanced solid tumours: a study of the Princess Margaret Consortium. *Br J Cancer*. 2015;113(11):1534-40.
238. Robles AJ, Kurmasheva RT, Bandyopadhyay A, Phelps DA, Erickson SW, Lai Z, et al. Evaluation of Eribulin Combined with Irinotecan for Treatment of Pediatric Cancer Xenografts. *Clin Cancer Res*. 2020;26(12):3012-23.
239. Pairawan S, Zhao M, Yuca E, Annis A, Evans K, Sutton D, et al. First in class dual MDM2/MDMX inhibitor ALRN-6924 enhances antitumor efficacy of chemotherapy in TP53 wild-type hormone receptor-positive breast cancer models. *Breast Cancer Res*. 2021;23(1):29.
240. Helfrich BA, Gao D, Bunn PA, Jr. Eribulin inhibits the growth of small cell lung cancer cell lines alone and with radiotherapy. *Lung Cancer*. 2018;118:148-54.
241. Isono M, Hoffmann MJ, Pinkerneil M, Sato A, Michaelis M, Cinatl J, Jr., et al. Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 strongly sensitises urothelial carcinoma cells to gemcitabine. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):1.
242. Hatami E, Nagesh PKB, Jaggi M, Chauhan SC, Yallapu MM. Gambogic acid potentiates gemcitabine induced anticancer activity in non-small cell lung cancer. *Eur J Pharmacol*. 2020;888:173486.
243. Jakštys B, Ruzgys P, Tamošiūnas M, Šatkauskas S. Different Cell Viability Assays Reveal Inconsistent Results After Bleomycin Electrotransfer In Vitro. *J Membr Biol*. 2015;248(5):857-63.
244. Ono H, Sowa Y, Horinaka M, Iizumi Y, Watanabe M, Morita M, et al. The histone deacetylase inhibitor OBP-801 and eribulin synergistically inhibit the growth of triple-negative breast cancer cells with the suppression of survivin, Bcl-xL, and the MAPK pathway. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;171(1):43-52.
245. Ono H, Basson MD, Ito H. PTK6 Potentiates Gemcitabine-Induced Apoptosis by Prolonging S-phase and Enhancing DNA Damage in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Res*. 2015;13(8):1174-84.
246. Ono H, Basson MD, Ito H. P300 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7(32):51301-10.
247. Jiang Y, Dai H, Li Y, Yin J, Guo S, Lin SY, et al. PARP inhibitors synergize with gemcitabine by potentiating DNA damage in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2019;144(5):1092-103.
248. Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda K, Baron B, Akada J, et al. The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Sensitizes Gemcitabine-Induced Cytotoxicity in Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells Possibly Through Inhibition of the DNA Repair Protein Gamma-H2AX. *Target Oncol*. 2015;10(4):575-81.
249. Jones RM, Kotsantis P, Stewart GS, Groth P, Petermann E. BRCA2 and RAD51 promote double-strand break formation and cell death in response to gemcitabine. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(10):2412-21.
250. Hinz TK, Kalkur R, Rabinovitch J, Hinkle W, Heasley LE. TP53 Null Mutations Identify Lung Cancer Cell Lines with Highest Sensitivity to the Nontaxane Microtubule Inhibitor Eribulin. *Mol Pharmacol*. 2021;100(2):144-54.
251. Wozniak A, Boeckx B, Modave E, Weaver A, Lambrechts D, Littlefield BA, et al. Molecular Biomarkers of Response to Eribulin in Patients with Leiomyosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2021;27(11):3106-15.
252. Jung YS, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*. 2010;22(7):1003-12.

253. Koike M, Yutoku Y, Koike A. Accumulation of p21 proteins at DNA damage sites independent of p53 and core NHEJ factors following irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):39-43.
254. Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibaldi D, Arribas J, Biankin AV, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):254-68.
255. Fujii E, Kato A, Suzuki M. Patient-derived xenograft (PDX) models: characteristics and points to consider for the process of establishment. *J Toxicol Pathol.* 2020;33(3):153-60.
256. Meehan TF, Conte N, Goldstein T, Inghirami G, Murakami MA, Brabetz S, et al. PDX-MI: Minimal Information for Patient-Derived Tumor Xenograft Models. *Cancer Res.* 2017;77(21):e62-e6.
257. Sadeghi S, Groshen SG, Tsao-Wei DD, Parikh R, Mortazavi A, Dorff TB, et al. Phase II California Cancer Consortium Trial of Gemcitabine-Eribulin Combination in Cisplatin-Ineligible Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma: Final Report (NCI-9653). *J Clin Oncol.* 2019;37(29):2682-8.
258. Rajput S, Guo Z, Li S, Ma CX. PI3K inhibition enhances the anti-tumor effect of eribulin in triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2019;10(38):3667-80.
259. Miki S, Imamichi S, Fujimori H, Tomiyama A, Fujimoto K, Satomi K, et al. Concomitant administration of radiation with eribulin improves the survival of mice harboring intracerebral glioblastoma. *Cancer Sci.* 2018;109(7):2275-85.
260. Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takada K, Takahashi K, Noda S, et al. Use of Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) to predict the treatment response to eribulin chemotherapy in breast cancer. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170634.
261. Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Morisaki T, Fujita H, et al. Eribulin Promotes Antitumor Immune Responses in Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2018;38(5):2929-38.
262. Kashiwagi S, Tsujio G, Asano Y, Goto W, Takada K, Takahashi K, et al. Study on the progression types of cancer in patients with breast cancer undergoing eribulin chemotherapy and tumor microenvironment. *J Transl Med.* 2018;16(1):54.
263. Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takada K, Morisaki T, Kouhashi R, et al. Validation of Systemic and Local Tumour Immune Response to Eribulin Chemotherapy in the Treatment of Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2020;40(6):3345-54.
264. Im MM, Flanagan SA, Ackroyd JJ, Knapp B, Kramer A, Shewach DS. Late DNA Damage Mediated by Homologous Recombination Repair Results in Radiosensitization with Gemcitabine. *Radiat Res.* 2016;186(5):466-77.
265. Cornillie J, Wozniak A, Li H, Wang Y, Boeckx B, Gebreyohannes YK, et al. Establishment and Characterization of Histologically and Molecularly Stable Soft-tissue Sarcoma Xenograft Models for Biological Studies and Preclinical Drug Testing. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(6):1168-78.
266. Smith JW, 2nd, Vukelja S, Hoffman AD, Jones VE, McIntyre K, Berrak E, et al. Phase II, Multicenter, Single-Arm, Feasibility Study of Eribulin Combined With Capecitabine for Adjuvant Treatment in Estrogen Receptor-Positive, Early-Stage Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2016;16(1):31-7.





# Anexos



## ANEXO I: Datos suplementarios

Tabla S17: Análisis univariante del ensayo ISG-ST5 1001.

	Supervivencia libre de progresión		Supervivencia global	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Grupo EE RECIST	0,368 (0,132-1,024)	0,055	0,272 (0,095-0,82)	0,016
Grupo RP RECIST	0,124 (0,023-0,678)	0,016	0,083 (0,009-0,740)	0,026
Grupo EE CHOI	0,431 (0,072-2,580)	0,357	0,388 (0,035-4,281)	0,440
Grupo RP CHOI	0,623 (0,186-2,089)	0,443	0,706 (0,161-3,103)	0,645
RT previa	1,182 (0,652-2,142)	0,582	1,574 (0,757-3,272)	0,225
Tratamiento	1,351 (0,872-2,093)	0,177	1,663 (0,924-2,995)	0,090
ECOG 1	1,367 (0,847-2,206)	0,201	1,801 (0,980-3,308)	0,058
Edad	0,999 (0,981-1,017)	0,910	1,002 (0,979-1,025)	0,884
Mujer	0,944 (0,603-1,479)	0,802	0,800 (0,437-1,465)	0,470
Histología: Sarcoma sinovial	2,602 (1,273-5,316)	0,009	2,920 (1,061-8,036)	0,038
Histología: MPNST	4,402 (1,905-10,173)	<0,001	5,952 (1,943-18,237)	0,002
Histología: Leiomiomasarcoma	1,891 (0,760-4,703)	0,171	3,154 (0,960-10,362)	0,058
Histología: UPS	2,354 (1,162-4,773)	0,018	1,985 (0,708-5,572)	0,193
Histología: Sarcoma de cél. fusiformes no clasif.	2,591 (0,326-20,602)	0,368	0,000 (0,000-Inf.)	0,998
Histología: Liposarcoma pleomórfico	0,000 (0,000-Inf.)	0,996	0,000 (0,000-Inf.)	0,998
Localización tumoral: Pared torácica	1,186 (0,289-4,872)	0,813	1,017 (0,139-7,466)	0,987
Localización tumoral: Pared abdominal	1,443 (0,199-10,446)	0,717	2,751 (0,374-20,228)	0,320
Localización tumoral: Paravertebral	3,136 (0,430-22,845)	0,259	5,175 (0,698-38,353)	0,108
Localización tumoral: Cintura escapular	1,792 (0,884-3,636)	0,106	1,653 (0,688-3,972)	0,262
Localización tumoral: Miembros superiores	0,834 (0,302-2,305)	0,727	1,213 (0,370-3,978)	0,750
Localización tumoral: Pelvis	1,068 (0,544-2,097)	0,850	0,936 (0,363-2,412)	0,891
Tamaño tumoral	1,003 (0,998-1,007)	0,248	1,001 (0,994-1,007)	0,848
Expresión positiva de MRP-1	1,897 (1,170-3,075)	0,009	1,685 (0,908-3,128)	0,098
Intensidad alta de MRP-1	1,767 (1,110-2,814)	0,016	1,829 (1,006-3,328)	0,048

**Tabla S18: Energía de afinidad de avapritinib y nilotinib para las distintas estructuras de MRP-1.** Cada valor corresponde a la energía de afinidad (en kcal/mol) de la pose con menor energía de afinidad del *docking* rígido.

<b>Modelo (Template)</b>	<b>Avapritinib (kcal/mol)</b>	<b>Nilotinib (kcal/mol)</b>
1 (6uy0.1.A)	-9,8	<b>-11,7</b>
2 (6bhu.1.A)	-10,3	-10,5
3 (5uj9.1.A)	<b>-10,5</b>	-9,8
4 (5uja.1.A)	-9,4	-10,5
5 (6yu0.1.A)	-10,0	-11,3
6 (6bhu.1.A)	-9,8	-10,5
7 (5uj9.1.A)	<b>-10,5</b>	-9,6
8 (5uja.1.A)	-8,8	-10,4
9 (6pzi.1.A)	-9,7	-10,0
10 (6pzb.1.A)	-9,5	-10,3
11 (6pzc.1.A)	-9,6	-10,3
12 (5ko2.2.A)	-9,4	-10,0
13 (5kpd.1.A)	-9,5	-11,0
14 (5kpd.1.A)	-9,5	-10,8
15 (5koy.2.A)	-9,7	-11,1
16 (5ko2.1.A)	-9,7	<b>-11,8</b>
17 (3g5u.2.A)	-9,4	-9,8
18 (3g5u.1.A)	-10,0	-10,6
19 (6ujr.1.A)	-9,6	-10,2
20 (4lsg.2.A)	-9,4	-10,5
21 (4lsg.1.A)	-9,8	-10,6
22 (5kpi.1.A)	-9,8	-10,7
23 (5kpi.2.A)	-9,8	-10,5
<b>Media</b>	<b>-9,70</b>	<b>-10,54</b>

**Tabla S19: Índices de combinación para las diferentes combinaciones secuencias de eribulina y gemcitabina en las líneas celulares CP0024, SK-UT-1, 93T449 y 94T778.** En las filas se representan las diferentes concentraciones de ambos fármacos y en las columnas las diferentes secuencias de combinación. ERI: eribulina, GEM: gemcitabina, [E]: concentración de eribulina, [G]: concentración de gemcitabina.

**CP0024**

Secuencia [E] y [G] nM	Concomitante	GEM -> ERI	ERI -> GEM
0,1	0,096	0,207	0,274
1	0,252	0,355	0,083
10	1,964	0,636	0,429

**SK-UT-1**

Secuencia [E] y [G] nM	Concomitante	GEM -> ERI	ERI -> GEM
0,1	0,071	0,053	0,031
1	0,523	0,125	0,203
10	4,344	0,831	1,240

**94T778**

Secuencia [E] y [G] nM	Concomitante	GEM -> ERI	ERI -> GEM
0,1	1,115	0,046	0,174
1	0,290	0,380	0,176
10	2,513	3,583	1,124

**93T449**

Secuencia [E] y [G] nM	Concomitante	GEM -> ERI	ERI -> GEM
0,1	0,085	0,326	1,249
1	0,671	0,176	0,198
10	6,160	1,102	1,173

## ANEXO II: Contribuciones científicas durante la etapa de doctorado

### Publicaciones

1. Martín-Broto J<sup>#</sup>, **Lopez-Alvarez M<sup>#</sup>**, Moura DS, Ramos R, Collini P, Romagosa C, Bagué S, Renne SL, Barisella M, Vélasco V, Coindre JM, Lopez-Lopez D, Dopazo J, Gambarotti M, Braglia L, Merlo DF, Palmerini E, Stacchiotti S, Quagliuolo VL, Lopez-Pousa A, Grignani G, Blay JY, Brunello A, Gutierrez A, Valverde C, Hindi N, Dei Tos AP, Picci P, Casali PG, Gronchi A. Predictive value of MRP-1 in localized high-risk soft tissue sarcomas: a translational research associated to ISG-STS 1001 randomized phase III trial. *Mol Cancer Ther.* 2021 Sep 22;molcanther.0315.2021. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0315. Epub ahead of print. PMID: 34552008.
2. Moura DS, Peña-Chilet M, Cordero Varela JA, Alvarez-Alegret R, Agra-Pujol C, Izquierdo F, Ramos R, Ortega-Medina L, Martin-Davila F, Castilla-Ramirez C, Hernandez-Leon CN, Romagosa C, Vaz Salgado MA, Lavernia J, Bagué S, Mayodormo-Aranda E, Vicioso L, Hernández Barceló JE, Rubio-Casadevall J, de Juan A, Fiaño-Valverde MC, Hindi N, **Lopez-Alvarez M**, Lacerenza S, Dopazo J, Gutierrez A, Alvarez R, Valverde C, Martinez-Trufero J, Martín-Broto J. A DNA damage repair gene-associated signature predicts responses of patients with advanced soft-tissue sarcoma to treatment with trabectedin. *Mol Oncol.* 2021 May 13. doi: 10.1002/1878-0261.12996. Epub ahead of print. PMID: 33983674.
3. Martín-Broto J, Hindi N, Grignani G, Martinez-Trufero J, Redondo A, Valverde C, Stacchiotti S, Lopez-Pousa A, D'Ambrosio L, Gutierrez A, Perez-Vega H, Encinas-Tobajas V, de Alava E, Collini P, Peña-Chilet M, Dopazo J, Carrasco-Garcia I, **Lopez-Alvarez M**, Moura DS, Lopez-Martin JA. Nivolumab and sunitinib combination in advanced soft tissue sarcomas: a multicenter, single-arm, phase Ib/II trial. *J Immunother Cancer.* 2020 Nov;8(266):e001561. doi: 10.1136/jitc-2020-001561. PMID: 33203665; PMCID: PMC7674086.
4. Fernandez-Serra A, Moura DS, Sanchez-Izquierdo MD, Calabuig-Fariñas S, **Lopez-Alvarez M**, Martínez-Martínez A, Carrasco-Garcia I, Ramírez-Calvo M, Blanco-Alcaina E, López-Reig R, Obrador-Hevia A, Alemany R, Gutierrez A, Hindi N, Poveda A, Lopez-Guerrero JA, Martín-Broto J. Prognostic Impact of *let-7e* MicroRNA and Its Target Genes in Localized High-Risk Intestinal GIST: A Spanish Group for Research on Sarcoma (GEIS) Study. *Cancers (Basel).* 2020 Oct 14;12(10):2979. doi:

- 10.3390/cancers12102979. PMID: 33066614; PMCID: PMC7602387.
5. Martínez-Delgado P, Lacerenza S, Obrador-Hevia A, **Lopez-Alvarez M**, Mondaza-Hernandez JL, Blanco-Alcaina E, Sanchez-Bustos P, Hindi N, Moura DS, Martin-Broto J. Cancer Stem Cells in Soft-Tissue Sarcomas. *Cells*. 2020 Jun 10;9(6):1449. doi: 10.3390/cells9061449. PMID: 32532153; PMCID: PMC7349510.
  6. Moura DS, Sanchez-Bustos P, Fernandez-Serra A, **Lopez-Alvarez M**, Mondaza-Hernandez JL, Blanco-Alcaina E, Gavilan-Naranjo A, Martinez-Delgado P, Lacerenza S, Santos-Fernandez P, Carrasco-Garcia I, Hidalgo-Rios S, Gutierrez A, Ramos R, Hindi N, Taron M, Lopez-Guerrero JA, Martin-Broto J. *CUL4A*, *ERCC5*, and *ERCC1* as Predictive Factors for Trabectedin Efficacy in Advanced Soft Tissue Sarcomas (STS): A Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS) Study. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 30;12(5):1128. doi: 10.3390/cancers12051128. PMID: 32365979; PMCID: PMC7281106.
  7. Puerto-Camacho P, Amaral AT, Lamhamedi-Cherradi SE, Menegaz BA, Castillo-Ecija H, Ordóñez JL, Domínguez S, Jordan-Perez C, Diaz-Martin J, Romero-Pérez L, **Lopez-Alvarez M**, Civantos-Jubera G, Robles-Frías MJ, Biscuola M, Ferrer C, Mora J, Cuglievan B, Schadler K, Seifert O, Kontermann R, Pfizenmaier K, Simón L, Fabre M, Carcaboso ÁM, Ludwig JA, de Álava E. Preclinical Efficacy of Endoglin-Targeting Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2019 Apr 1;25(7):2228-2240. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0936. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30420447; PMCID: PMC6445738.
  8. Moura DS, Ramos R, Fernandez-Serra A, Serrano T, Cruz J, Alvarez-Alegret R, Ortiz-Duran R, Vicioso L, Gomez-Dorransoro ML, Garcia Del Muro X, Martinez-Trufero J, Rubio-Casadevall J, Sevilla I, Lainez N, Gutierrez A, Serrano C, **Lopez-Alvarez M**, Hindi N, Taron M, López-Guerrero JA, Martin-Broto J. Gene expression analyses determine two different subpopulations in KIT-negative GIST-like (KNGL) patients. *Oncotarget*. 2018 Apr 3;9(25):17576-17588. doi: 10.18632/oncotarget.24799. PMID: 29707131; PMCID: PMC5915139.



**Comunicaciones a congresos**

1. **2020 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting.** (Virtual) 29-31 Mayo 2020.

Moura DS, Hindi N, Lopez-Alvarez M, Sanchez-Bustos P, Carrasco-Garcia I, Santos-Fernandez P, Martinez-Delgado P, Lacerenza S, Blanco-Alcaina E, Mondaza-Hernandez JL, Gutierrez A, Alvarez-Alvarez R, Cordeiro M, De Sande-Gonzalez LM, Marquina G, Cano JM, Cruz J, Valverde C, Martinez-Trufero J, Martin-Broto J. *Immune-checkpoint genes as predictive biomarkers of trabectedin in advanced soft-tissue sarcoma (STS): A Spanish Group for Research on Sarcomas (GEIS) translational study.*

2. **CTOS Annual Meeting 2018.** Roma, Italia. 14-17 Noviembre 2018

**Lopez-Alvarez M**, Moura DS, Sanchez-Bustos P, Salinas A, Hindi N, Taron M, Martin-Broto J. *Combination of Eribulin plus Gemcitabine in L-sarcomas.*

3. **ESMO: European Society for Medical Oncology Congress.** Munich, Alemania. 19-23 Octubre 2018.

Moura DS, **Lopez-Alvarez M**, Salinas A, Sanchez-Bustos P, Hindi N, Taron M, Martin-Broto J. *Combination of Eribulin plus Gemcitabine in L-sarcomas.*