

**Regulación de las vías MAPK y Akt-FoxO1
en el mecanismo molecular de acción del
Minerval contra el cáncer de
pulmón y glioma**

Tesis Doctoral

Mónica Higuera Urbano





Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Departament de Biologia

Regulación de las vías MAPK y Akt-FoxO1 en el mecanismo molecular de acción del Minerval contra el cáncer de pulmón y glioma

Tesis Doctoral

Mónica Higuera Urbano

Mallorca, 2012

Universitat de les Illes Balears

Nosaltres, el Dr. Pablo Escribá, Catedràtic de la Facultat de Ciències de la Universitat de les Illes Balears i la Dra. Silvia Terés,

CERTIFIQUEM:

Que el present treball titulat "Regulación de las vías MAPK y Akt-FoxO1 en el mecanismo molecular de acción del Minerval contra el cáncer de pulmón y glioma", presentat per Mónica Higuera Urbano, per optar al TÍTOL univesitari oficial de DOCTOR per la Universitat de les Illes Balears dins del programa de doctorat en Biotecnologia, Genètica i Biologia Cel·lular, s'ha realitzat sota la nostra direcció al Departament de Biologia de la Facultat de Ciències de la Universitat de les Illes Balears.

Revisat el present treball, autoritzo la seva presentació per que pugui ésser jutjada pel tribunal corresponent.

Palma de Mallorca, 16 de desembre del 2011

Director

Director

Autor

Dr. Pablo Escribá

Dra. Silvia Terés

Mónica Higuera

“I així pren tot el fruit que et pugui donar el camí que, poc a poc, escrius per a demà. Que demà mancarà el fruit de cada pas, per això, malgrat la boira, cal caminar”

Que tinguem sort. Lluís Llach

A mis padres y hermanas.

Por su amor sin condiciones.

Agradecimientos/Agraïments

Te pasas la tesis deseando que llegue este momento, por dos motivos. El primero es que ello significa que has terminado una etapa importante de tu vida y el segundo, porque son muchas las personas que han contribuido o que han sido indispensables para acabar esta tesis. Ahora frente a una hoja en blanco, es difícil empezar. Sólo espero no dejarme a nadie.

En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Pablo Escribá la oportunidad que me brindó para realizar esta Tesis Doctoral con él. A la Dra. Silvia Terés por haberme enseñado a trabajar con animales. Gracias a los dos por la confianza depositada en mí.

A todos mis compañeros de laboratorio:

María muchas gracias por tu ayuda sincera, no es fácil encontrar a personas con una calidad humana como la tuya, dispuestas a ayudar en lo que haga falta, gracias por todo. Dani, tengo una gran noticia... por fin acabé el resumen!! Al Dr. Xavier Busquets por sus aportaciones y los ánimos en la recta final, a Maitane y a David por ayudarme a entender el mundo de la membrana y por tener siempre un momento para mis preguntas sobre lípidos... ¡¡Es que es complicado!!, a Francis por su ayuda con la citometría sin tí hubiese sido muy complicado y por tener a punto siempre un tema de conversación ameno!!, a Gwendy, Manuel, Rafa, Joel... gracias a todos por haber estado siempre dispuestos a ayudarme. A en Víctor i n'Andrea, per aguantar les nostres converses interminables al despatx, i per no tenir mai un no per a resposta a qualsevol cosa que els demanem.

A las que me habéis acompañado en el camino del predoc y que os habéis portado inmejorablemente en esta última y especialmente dura etapa, gracias chicas, porque habéis sido más que una ayuda de compañeras y habéis hecho ladear la balanza hacia lo positivo, a pesar de todo ha sido un gran año!!. Os ha tocado aguantar los malos días... y también algunas risas (aunque sea a costa de ganarme "X"... je je). También por los consejos y las birras y cafeses, pero sobretodo por los ánimos que tanta falta me han hecho los últimos tiempos. Maria Antònia, molts d'ànims, tot arriba i tot s'acaba, ja saps, *"de vegades una tonteria de sobte ens indica que ens ensortim"*. Amaia, ánimo también, te queda un año duro e intenso, pero la recompensa está a la vuelta

de la esquina. Joaneta... ja t'ho he dit: molta sort d'ara endavant i gràcies per tot, perquè sense el teu recolçament tot hagués estat molt més dur i potser ara ni tant sols estaria escrivint aquestes línies. Y tú Laura que ya lo has conseguido, mucha suerte en NY y prepárate para recomendarnos desde tu nuevo destino, je je!!.

A ti Vicky, gracias por enseñarme a bucear en el mundo de las células y por haber sido una gran compañera y muchas veces, amiga. Te he echado de menos, sobre todo esta última etapa. Y tú Biel ya sabes que siempre te quise como compañero de tesis... y te he echado tantas veces de menos, cuántas conversaciones interesantes nos habremos perdido!! Prepárate para todo lo bueno que te tiene que llegar!!.

A todo el personal del edificio Guillem Colom, muchas gracias por ayudarme en todo lo que ha estado en vuestras manos, siempre con una sonrisa. A Teresa y Miguel del Estabulario, gracias por los consejos y las facilidades para llevar a cabo toda la experimentación animal. A Carlos Saus, por su inestimable ayuda con todo lo que respecta a la histología.

Al Dr. García Verdugo por la aportación de la microscopía electrónica y al Dr. Ulises Gómez Pinedo porque sin él hubiese sido imposible llevar a cabo los experimentos de estereotaxia, muchas gracias.

No puedo olvidarme de mi etapa IR y de su gente, a Laura y Eli, les debo dos enseñanzas indispensables para acabar una tesis con éxito (o al menos con la salud mental intacta): la primera es que la membrana siempre va en el blanco y la segunda y más importante: las penas con birras son menos!, gracias chicas, os he echado de menos.

A Esther, la mejor compañera que uno pueda esperar encontrar y por supuesto, mi amiga. Te he echado tanto de menos, tú me enseñaste casi todo lo que he necesitado este tiempo en el laboratorio, WB, IHQ, RT...y sacaste lo mejor de mí en un mal momento y yo di por supuesto que habría más gente como tú... sin embargo, eres especial! Se rumorea que nunca más han reñido a nadie en el IR por reírse a carcajadas como las gremlins de la Retinopatía... Gracias porque del IR solo puedo recordar buenos momentos!!

I tu Noe, no sé com t'ho has fet però has tingut l'habilitat de trucar-me cada cop que necessitava sentir una veueta que em digués que tot aniria bé, que jo podia. T'has preocupat per mí i has fet tot el que ha calgut i més per ajudar-me. Moltes gràcies cuqueta.

A les meves bruixes, perquè no puc concebir la biología sense vosaltres, que m'heu acompanyat des del primer dia. L'Anna i la Sandra, que han aguantat com a campiones les històries predoc de la Berta i les meves... cada dia amb una de nova, consells per mail, per telèfon, ànims amb birres, soparets, bruixes invisibles... tot això amb un mar de distància, però sempre, sempre amb un somriure... I tu Berta, que et puc dir, m'has ajudat en tot... Saps que hi ha coses que a vegades no es poden escriure. Tu has viscut en primera persona totes les meves predoc-"aventures" i les has compartit amb mí sempre amb el millor humor possible, i no sempre ha sigut fàcil. Gràcies bruixetes del meu cor pel vostre ajut.

A mí gran amigo Alex, por preocuparte por mí, por arrancarme una carcajada de mis dramas... porque si necesito animarme y sonreír sé qué número he de marcar. Este tiempo que has estado en Palma ha sido un soplo de aire fresco para mí. Son tantos años... y ahí seguimos y seguiremos.

A la Susa, que incluso se aprendió el fundamento de la real time... eso sí que es una amiga. Gracias por tus consejos, por tu saber escuchar incansable, por aportar una nota de objetividad y apaciguarme los ánimos. Porque solo con verme la cara sabes que algo pasa y no te rindes hasta que consigues ayudarme.

No pueden faltar mis amigos de l'Aldea, que me han proporcionado los oasis necesarios para sobrevivir a la Tesis, gracias por los veranos, por vuestra amistad sincera e inamovible. Carmen, Bea, Marta, Pamela, Teyo... gracias por seguir ahí, por preocuparos y por venir a verme hasta aquí (o al menos intentarlo!!).

A mí abuela, que nos ha enseñado que cuando regalas amor sincero, la vida te lo devuelve. Gracias yaya por enseñarnos que lo más importante en esta vida es ser generoso y mantenerse fiel a uno mismo, lo demás va llegando. A mí familia, mí tío Fulgencio Higuera y a mí tía Margarita Urbano, por su apoyo incondicional y por sentirse orgullosos de mí.

Als petits que tant i tant m'estimo, els meus nebots, Iker i Patrícia, perquè han aconseguit fer aquesta família encara més gran. Per les seves abraçades, perquè els seus somriures sincers fan oblidar qualsevol problema. A Joan Carles, Jorge i Sergi, per la part que els ha tocat... per formar part del clan... i per haver participat en les petites personetes que han arribat a la família i les que encara han d'arribar...

A mis padres, que han hecho todo esto posible con su amor, comprensión y apoyo. A ti papá, gracias por enseñarme el valor de los valores. El valor del trabajo, del esfuerzo y del compromiso que me han conducido hasta aquí. Por tus principios inquebrantables con los que he tenido la suerte y el privilegio de crecer. Y a ti, mamá, que nos has enseñado que hay que luchar aunque la vida no te lo ponga fácil, sobretodo, en ese caso. Gracias a los dos por haberme enseñado a caminar mirando siempre hacia adelante. Gracias por haber respetado todas mis decisiones, sin juzgarlas. Pero sobretodo, gracias por haberme hecho el regalo más grande, mis hermanas.

A mis hermanas: Yolanda, Begoña y Eva: "Ai si no fos per la tendressa, que ens cura quan fa por la solitud". Porque aunque esté lejos, ellas me hacen sentir cerca. Por compartir conmigo ese lenguaje sin palabras en el que no hacen falta explicaciones. Por estar siempre ahí, sin preguntar, sin condiciones, sin exigir, simplemente estando, preparadas para el rescate en cualquier momento. Porque sé que haga lo que haga y esté donde esté, nunca estaré sola. No puedo decirles nada más que una y mil veces gracias.

"Que junts hem caminat en la joia, junts, en la pena, junts i has omplert tant sovint la buidor dels meus mots i en la nostra partida sempre m'has donat un bon joc, per tot això i coses que t'amago, ara vull agrairte tant temps que fa que t'estimo". El camino ha sido largo y muchas veces, difícil. Al final lo conseguimos. Tú mejor que nadie sabes que esta tesis sin ti no tendría sentido. Gracias, Igor, por estos años. Lo mejor está por venir.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. El Cáncer	19
1.1.1. Glioma	21
1.1.2. Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).....	22
1.2. Ciclo celular	23
1.2.1. Control del ciclo celular.....	23
1.2.1.1 Familia CIP/KIP	25
1.2.1.2. La familia INK4	26
1.2.1.3. pRb/E2F.....	26
1.3. Principales vías de señalización reguladoras de la proliferación celular.....	28
1.3.1. Receptores Tirosín-quinasas (RTKs).....	28
1.3.1.1. Receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR)	29
1.3.1.2. EGFR y cáncer	31
1.3.2. Vía de las quinasas activadas por mitógenos	32
1.3.2.1. RAS	34
1.3.2.2. RAF.....	34
1.3.2.3. MEK y ERK.....	35
1.3.2.4. MAPKs y cáncer	36

1.3.3.	Vía PTEN/PI3K/Akt.....	37
1.3.3.1.	Vía PI3K/Akt y progresión del ciclo celular	38
1.3.3.2.	PI3K/Akt y cáncer	39
1.3.4.	Factores de transcripción FoxO.....	40
1.3.4.1.	Factores FoxO y progresión del ciclo celular.....	41
1.3.4.2.	Regulación de los factores FoxO.....	42
1.3.4.3.	Factores FoxO y cáncer.....	43
1.4.	Tipos de muerte celular	44
1.4.1.	Apoptosis	46
1.4.1.1.	Vía Extrínseca.....	46
1.4.1.2.	Vía intrínseca	47
1.4.2.	Necrosis	48
1.4.3.	Catástrofe Mitótica	48
1.4.4.	Senescencia.....	50
1.4.5.	Autofagia.....	50
1.4.5.1.	Proteínas Atg	52
1.4.5.2.	Regulación de la autofagia	53
1.4.5.3.	Autofagia y cáncer	55
1.5.	Terapia lipídica de membrana	56
1.5.1.	Estructura lipídica de la membrana	58
1.5.2.	Estructura lipídica y función celular	60
1.5.3.	Modulación de la estructura de la membrana lipídica	61
1.5.4.	Terapia lipídica de membrana en el tratamiento de patologías humanas.....	61
1.5.4.1.	Terapia Lipídica y Cáncer: Minerval y su efecto antitumoral	63

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	67
2.1.	Cultivo celular	69
2.1.1.	Tratamientos Celulares	69
2.1.1.1.	Ensayos de viabilidad celular	70
2.1.1.2.	Análisis de la señalización celular	70
2.2.	Animales de experimentación.....	70
2.2.1.	Tratamiento de los animales	71
2.2.2.	Inoculación subcutánea de células tumorales y medición del tumor	72
2.2.3.	Inoculación intracraneal de células de glioma humano SF-767	73
2.2.3.1.	Obtención de las muestras de cerebro inoculado con células SF-767	75
2.2.4.	Marcaje y detección de proteínas en modelos animales de cáncer humano.....	76
2.3.	Estudios regulatorios de toxicidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	76
2.4.	Citometría de Flujo	77
2.5.	Detección y cuantificación de proteínas mediante técnicas inmunológicas (<i>Western Blot</i>)	77
2.5.1.	Extracción de proteínas de tumores de ratón	78
2.5.2.	Extracción de proteínas celulares de cultivos <i>in vitro</i>.....	78
2.5.3.	Determinación del contenido proteico de las muestras	78
2.5.4.	Detección inmunológica: electroforesis e inmunoblot	79
2.6.	Inmunohistoquímica	82
2.6.1.	Tinción de las muestras con hematoxilina y eosina	82

2.6.2.	Marcaje de muestras de tumores de ratón con anticuerpos	82
2.7.	Microscopía de fluorescencia confocal	84
2.8.	Microscopía electrónica.....	85
2.9.	Análisis de datos	85
3.	OBJETIVOS	87
4.	RESULTADOS.....	91
4.1.	Efecto del Minerval sobre la progresión de xenotrasplantes en ratones inmunodeprimidos	93
4.2.	Efecto del Minerval sobre células de glioma humano (SF-767)	95
4.2.1.	Efecto del Minerval en la progresión de xenotrasplantes de la línea celular de glioma humano (SF-767) en ratones inmunodeprimidos.....	95
4.2.2.	Estudio de recidiva y terapia combinada en tratamientos con Minerval y Temozolomida.....	96
4.2.3.	Estudio citohistológico de xenotrasplantes de la línea celular de glioma humano (SF-767).....	98
4.2.4.	Efecto del Minerval en un modelo ortópico de células de glioma humano (SF-767) en ratones desnudos.....	100
4.2.5.	Minerval induce la parada del ciclo celular en células (SF-767).....	102
4.2.6.	Efecto del Minerval sobre los niveles de proteínas CDK 2, 4 y 6 y Ciclinas D1, D3 y E en células de glioma humano (SF-767)	103
4.2.7.	Efecto del Minerval sobre los niveles de proteínas CDK 2, 4 y 6 y Ciclinas D1, D3 y E en xenotrasplantes de células de glioma humano (SF-767).....	105

4.2.8. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en células de glioma humano (SF-767).....	106
4.2.9. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en xenotrasplantes de células de glioma humano (SF-767).....	108
4.2.10. Efecto del Minerval sobre la vía EGFR/RAS/MAPK en células y xenotrasplantes de glioma humano (SF-767).....	110
4.2.11. El Minerval induce diferenciación en tumores derivados de células de glioma humano (SF-767).	113
4.2.12. El Minerval induce autofagia en células de glioma humano (SF-767)	116
4.2.13. El Minerval induce autofagia en tumores derivados de células de glioma humano (SF-767).....	120
4.3. Efecto del Minerval sobre células de cáncer de pulmón no microcítico (A549)	122
4.3.1. Efecto del Minerval sobre la progresión de xenotrasplantes de la línea celular A549 en ratones inmunodeprimidos.....	122
4.3.2. Estudio citohistológico de xenotrasplantes de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549).....	124
4.3.3. Efecto del Minerval sobre la viabilidad celular en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón(MRC5)	126
4.3.4. Efecto del Minerval sobre la Vía EGFR/Akt	128
4.3.4.1. Detección del estado de fosforilación de EGFR en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)	128
4.3.4.2. Detección de EGFR in vivo en ratones inmunodeprimidos	129
4.3.4.3. Detección del estado de fosforilación de PTEN y PDK1 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)	131
4.3.4.4. Detección del estado de fosforilación de PTEN y PDK1 en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549).....	133

4.3.4.5. Detección del estado de fosforilación de Akt en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5).....	135
4.3.4.6. Detección del estado de la fosforilación de Akt en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549).....	137
4.3.5. Efecto del Minerval sobre la vía de las MAPKs en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)	139
4.3.5.1. Detección del estado de fosforilación de MEK y ERK en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5).....	139
4.3.5.2. Detección del estado de fosforilación de MEK y ERK en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)	141
4.3.6. Efecto del Minerval sobre el factor de transcripción FoxO1 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)	143
4.3.7. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)	146
4.3.8. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en xenotrasplantes de células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549).....	148
4.4. Estudios de toxicidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	150
5. DISCUSIÓN.....	153
5.1. Eficacia del Minerval <i>in vivo</i>.....	155
5.1.1. Eficacia del Minerval en un modelo de xenotrasplante de glioma humano (SF-767)	155
5.1.2. Eficacia del Minerval en un modelo de xenotrasplante de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549).....	157

5.2.	Efecto del Minerval sobre la vía EGFR/RAS	158
5.3.	Efecto del Minerval sobre la vías MAPK y Akt-FoxO1	162
5.4.	El Minerval induce parada del ciclo celular y diferenciación celular <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	164
5.5.	El Minerval induce autofagia en células de glioma y xenotrasplantes de glioma humano.....	166
5.6.	El Minerval como posible fármaco candidato en la terapia del cáncer de pulmón no microcítico y el glioma.....	168
6.	CONCLUSIONES	171
7.	PUBLICACIONES	175
7.1.	Publicaciones relacionadas con la Tesis	177
7.2.	Otras Publicaciones	177
7.3.	Patentes.....	177
8.	BIBLIOGRAFÍA	179

ABREVIATURAS

2OHOA, ácido 2-hidroxioléico, Minerval

ADN, ácido desoxirribonucleico

AMPK, del inglés, 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (quinasa activada por adenosín monofosfato)

Apaf, del inglés, apoptotic protease activation factor (factor de activación de proteasas apoptóticas)

APC, del inglés, Anaphase-promoting complex (Complejo promotor de la anafase)

ARN, ácido ribonucleico

ARNsi, ácido ribonucleico de interferencia pequeño

ATP, adenosín trifosfato

ATR, del inglés, Ataxia telangiectasia and Rad3 related (Proteína de la Ataxia telangiectasia relacionada con Rad3)

BCA, del inglés, biconconinic acid (ácido biconconínico)

BH, Dominio de homología a Bcl-2

cAMP, del inglés, cyclic 5' adenosine monophosphate (adenosín monofosfato cíclico)

CDK, del inglés, cyclin dependent kinase (quinasa dependiente de ciclina)

CKI, del inglés, cyclin kinase inhibitor (inhibidor de la CDK)

CMA, del inglés, Chaperon mediated autophagy (Autofagia mediada por chaperonas)

DHFR, dihidrofolato reductasa

DISC, del inglés, death-inducing signal complex (complejo de muerte inducido por señales)

DVD, del inglés Domain for Versatile Docking (dominio de acoplamiento versátil)

ECACC, del Inglés European Collection of Cell Cultures (Colección europea de cultivo celular)

EGF, del inglés, epitelial growth factor (factor de crecimiento epitelial)

EGFR, del inglés, epitelial growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento epitelial)

ERK, del inglés, extracellular signal-regulated kinase (quinasa reguladas por señales extracelulares)

FADD, del inglés, Fas-associated death domain (dominio de muerte asociado a Fas)

FasL, del inglés, Fas ligand (ligando Fas)

G6Pasa, Glucosa 6 fosfatasa

GBM, Glioblastoma multiforme

GDP, Guanosín difosfato

GFAP, del inglés, glial fibrilar acidic protein (proteína glial fibrilar acídica)

GPCR, del inglés, G-proteins coupled receptor (receptor acoplado a proteínas G)

GSK3 β , del inglés, Glycogen synthase kinase 3 (Quinasa Glicógeno sintasa)

GTP, Guanosín trifosfato

HMBA, hexameten bisacetamida

HRP, del inglés Horseradish peroxidase (Peroxidasa de rábano)

HSP90, del inglés Heat shock protein 90 (Proteína de choque térmico 90)

IGFR, del inglés, insulin-like growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina)

IKK, del inglés, I kappa B kinase (quinasa de I kappa B)

JNK, del inglés, c-Jun N-terminal kinase (quinasa de c-Jun en posición N-terminal)

MAPK, del inglés, mitogen-activated protein kinase (proteína quinasa activada por mitógenos)

MnSOD, Manganeso superóxido dismutasa

MOMP, del inglés mitochondrial outer membrane permeabilization (permeabilización de la membrana externa de la mitocondria)

- MTT**, del inglés, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio)
- MVBs**, del inglés, multivesicular bodies, (cuerpos multivesiculares)
- NF- κ B**, del inglés, nuclear factor-kappa B (factor nuclear-kappa B)
- NSCLC**, del inglés, non small cell lung cancer (cáncer de pulmón de células no pequeñas)
- OMS**, Organización mundial de la salud
- PARP**, del inglés, poly(ADP-ribose) polymerase (polimerasa de poli-A ribosa)
- PB**, del inglés, phosphate buffer (solución tamponada con fosfato)
- PBS**, del inglés, phosphate balance salt (solución salina tamponada con fosfato)
- PCNA**, del inglés, proliferator cell nuclear antigen (antígeno nuclear de proliferación celular)
- PKD**, del inglés, phosphoinositide-dependent kinase (quinasa dependiente de fosfoinosítidos)
- PH**, dominios de homología a pleckstrina
- PI3K**, del inglés, PIP3-kinase (quinasa de fosfoinositol-trifosfato)
- PIP2**, del inglés, phosphatidylinositol diphosphate (fosfatidilinositol-difosfato)
- PIP3**, del inglés, phosphatidylinositol triphosphate (fosfatidilinositol-trifosfato)
- PKC**, del inglés, protein kinase C (proteína quinasa dependiente de Ca^{2+})
- pRb**, proteína del retinoblastoma
- PTEN**, del inglés, Phosphatase and tensin homolog, (proteína homóloga fosfatasa y tensina)
- PUFA**, del inglés polyunsaturated fatty acid (ácidos grasos poliinsaturados)
- RKIP**, del inglés, Raf kinase inhibitory protein (proteína quinasa inhibidora de Raf)
- RTK**, del inglés, receptor tyrosine kinase (receptor tirosina quinasa)
- SDS**, del inglés, sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)

SCLC, del inglés, small cell lung cancer (cáncer de pulmón de células pequeñas)

TBS, del inglés, Tris saline buffer (solución salina tamponada con Tris)

TGF, del inglés, transforming growth factor (factor de crecimiento transformante)

TMZ, temozolomida

TNF, del inglés, tumor necrosis factor (factor necrótico tumoral)

TNF, del inglés, tumor necrosis factor receptor (receptor del factor necrótico tumoral)

TRAIL, del inglés, TNF receptor apoptosis inductor ligand (receptor del ligando del inductor de apoptosis TNF)

Tris, tris(hidroximetil)aminometano

UVRAG, del inglés, ultraviolet radiation resistance-associated gene (gen asociado a la resistencia a la irradiación por ultravioletas)

VDAC, del inglés, voltage-dependent anions channel (canal de aniones dependiente de voltaje)

VEGF, del inglés, vascular-endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular)

X-Gal, bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Cáncer

Bajo el término de cáncer se engloba un conjunto de distintas patologías que presentan como característica común una desregulación en la división celular, pérdida de la diferenciación, aumento de la supervivencia y de la capacidad de migración celular (Corner y Bailey, 2001; Yarbrow *et al.*, 2005).

El proceso mediante el cual las células normales se transforman progresivamente en malignas, se debe a la adquisición secuencial de mutaciones que dañan el genoma y que confieren a las células tumorales características que les permiten evadir las barreras homeostáticas (Hanahan y Weinberg, 2000). Este proceso de malignización celular o transformación puede ser el resultado de eventos endógenos de la célula como errores en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), pérdida de la heterocigosidad (LOH), inestabilidad química intrínseca de algunas bases del ADN, radicales libres que se generan durante el metabolismo o por agentes exógenos como radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta y carcinógenos químicos (Bertram, 2001). Los fallos en los mecanismos de reparación del ADN celular, pueden ocasionar cambios permanentes en el genoma. Si estas mutaciones ocurren en genes responsables de la integridad del genoma esto facilitará la adquisición de otras mutaciones (Bertram, 2001).

La transición de una célula normal a una tumoral implica procesos en los cuales intervienen genes implicados en los mecanismos homeostáticos que controlan la proliferación celular y su muerte. Si estos cambios y mutaciones provocan la activación de genes que estimulan la proliferación o protegen a la célula de la muerte, nos referimos a oncogenes, si las mutaciones inactivan genes que inhiben normalmente la proliferación, nos referimos a los genes supresores de tumores (Bishop, 1996).

La progresión tumoral es un proceso con varias etapas y cada una refleja las alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de células normales en células invasivas, pasando por estados premalignos (Foulds, 1954). Se ha observado, que tanto la transformación de células *in vitro* como los modelos transgénicos de carcinogénesis, necesitan de varias mutaciones producidas en

diferentes etapas (Hahn *et al.*, 1999). Por tanto la sucesión de cambios genéticos que conceden ventajas a las células es lo que lidera su conversión a células cancerosas (Figura 1); (Nowell, 1976).

Las capacidades compartidas por la mayoría de todos los tipos tumorales humanos que se han propuesto son: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y capacidad de invasión y metástasis, reprogramación de la energía metabólica y la evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011).

Cada uno de estos cambios en la fisiología celular comprende decenas de vías, rutas y cascadas, cada una de ellas con sus correspondientes genes y proteínas implicadas. Por lo tanto para adquirir una de las capacidades, los tumores, pueden hacerlo a través de una o más de una de las posibles vías alternativas.

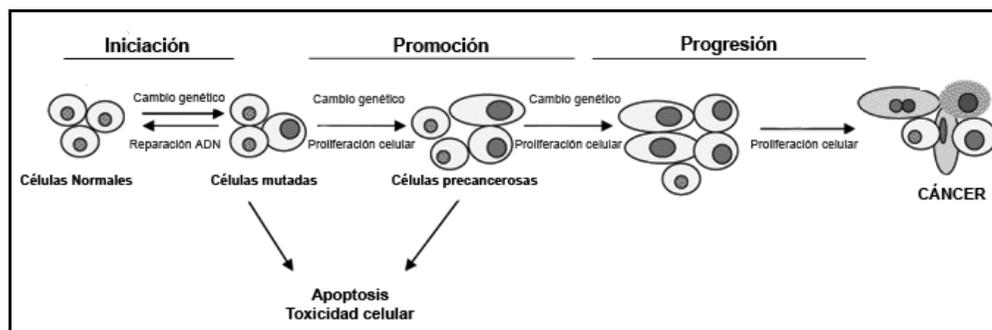


Figura 1. Proceso de carcinogénesis. La proliferación celular es un factor vital en el origen de mutaciones y en la expansión de los clones de las células que contienen dichas mutaciones

1.1.1. **Glioma**

Los tumores cerebrales constituyen aproximadamente un 2% de todas las neoplasias malignas (Furnari *et al.*, 2007). En general, presentan un amplio espectro de síntomas y un mal pronóstico. Los gliomas son los tumores cerebrales primarios más comunes. Éstos pueden derivar de tres tipos celulares: los astrocitos, los oligodendrocitos y las células ependimales (Sul y Fine, 2010).

La clasificación de los gliomas está basada en características histopatológicas. Las características histológicas principales en las que se basa el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), son las siguientes: atipia nuclear, actividad mitótica, proliferación vascular y necrosis (Gudinaviciene *et al.*, 2004). Atendiendo a estas características, los gliomas se clasifican en grados del I al IV.

El glioblastoma multiforme (GBM) está considerado por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad rara, ya que su incidencia anual en la población en Europa y Estados Unidos es de menos de 2-3 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente (SEER, 2007; WHO, 1992). El GBM es el tumor cerebral que presenta mayor malignidad, representando el 29% de todos los tumores cerebrales primarios y el 50% de los gliomas (Stark *et al.*, 2005). Estas características son más evidentes cuanto mayor es el grado de malignidad del tumor aunque debido a la heterogeneidad de las mismas, se hace necesario un sistema de clasificación y diagnóstico más objetivo, basado en las características moleculares de los diferentes gliomas. El grado de malignidad del tumor se relaciona directamente con la alteración en la expresión de proteínas que regulan positiva o negativamente el ciclo celular, la proliferación, la motilidad o la vascularización. El estudio de estas alteraciones conllevaría a un tratamiento más efectivo contra el glioma (Demuth y Berens, 2004).

Alteraciones en genes como la fosfatasa PTEN, p53/MDM2/p14^{ARF}, p16^{INK4}/RB1/CDK4, EGFR o VEGF, provocan alteraciones en la expresión de las proteínas implicadas en estas vías que favorecen la génesis del glioma (Arjona *et al.*, 2006; Ichimura *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 1996; Kaur *et al.*, 2004; Ware *et al.*, 2003).

La cirugía y la radioterapia es la aproximación terapéutica más efectiva para tratar el GBM, cuya media supervivencia es de menos de un 30% el primer año, del 5% a los tres años y del 3% a los cinco años (Isaacson, 2000; START, 2006). Actualmente el fármaco de elección es la temozolomida, un agente alquilante del ADN que induce inicialmente la regresión del tumor (Athanassiou *et al.*, 2005; Bredel, 2001), pero la esperanza de vida de los pacientes solo aumenta en 2,5 meses incrementando la media de supervivencia de 12,1 a 14,6 meses (Stupp *et al.*, 2005).

1.1.2. Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)

El cáncer de pulmón constituye el tipo de cáncer más frecuente en el mundo, es el tipo de cáncer más frecuente en hombres (16,5% de casos de cáncer por año) y el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres, después del cáncer de mama, el colorectal y el de cérvix de útero (8,5% de casos de cáncer por año). También es uno de los que presenta mayores tasas de mortalidad por cáncer representando el 28% de muertes producidas por cáncer en varones y del 27% en mujeres (Globocan, 2008; Siegel *et al.*, 2011).

La mayoría de los tipos de cáncer de pulmón son carcinomas, tumores malignos que provienen de células epiteliales. El cáncer de pulmón presenta dos categorías histopatológicas que se diferencian por el tamaño y la apariencia de las células malignas: el cáncer de pulmón microcítico (Small Cell Lung Cancer, SCLC), que representa el 16,8% y el cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) que representa el 80,4% el cual se divide en tres subtipos: carcinoma escamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes (MacKinnon *et al.*, 2010; Travis *et al.*, 1995).

Las células tumorales de cáncer de pulmón pueden presentar más de veinte alteraciones genéticas o epigenéticas (Sekido *et al.*, 2003). Estas alteraciones se encuentran en células preneoplásicas o en tejido epitelial bronquial con una apariencia histológica normal, lo cual sugiere que el cáncer se desarrolla a partir de tejido epitelial sano mediante un proceso secuencial de sucesos que provocan anomalías genéticas y epigenéticas, que en muchos casos están asociadas con el consumo de tabaco (Wistuba *et al.*, 2000a; Wistuba *et al.*, 2000b)

Los factores moleculares más importantes implicados en la patogénesis del cáncer de pulmón son: la inestabilidad génica, alteraciones en oncogenes o genes supresores de tumores, capacidad para evadir la apoptosis, sobreactivación de la telomerasa e incremento de la angiogénesis (Hiyama *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 2005; Lengauer *et al.*, 1998; O'Byrne *et al.*, 2000; Reissmann *et al.*, 1993; Sekido *et al.*, 2003; Weinstein, 2002).

1.2. Ciclo celular

La división celular consta de cuatro etapas: Fase Gap 1 (G1), fase de Síntesis de ADN (S), la fase Gap 2 (G2) y la fase de Mitosis (M) (Norbury y Nurse, 1992). La replicación del ADN se lleva a cabo en la fase S, la cual es precedida por la fase G1 durante la cual la célula se prepara para la síntesis del ADN, y viene seguida de la fase G2 durante la cual la célula se prepara para la mitosis. Antes de empezar a replicar el ADN, las células en G1 pueden entrar en una fase de quiescencia llamada G0, que es el estado en el que se encuentran la mayoría de células no proliferativas de los tejidos humanos.

1.2.1. Control del ciclo celular

El paso de una fase del ciclo a otra se da de forma ordenada y regulada mediante diferentes proteínas celulares. Las proteínas reguladoras son las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs), una familia de serina/treonina quinasas que se activan en puntos específicos del ciclo celular. Se han identificado nueve tipos de CDK, de las cuales, cinco están activas durante el ciclo. En la fase G1 las CDKs responsables del avance del ciclo celular son la CDK4 y CDK6, en la fase S se activa CDK2 y en G2/M CDK1. Cuando una CDK se activa, induce procesos corriente abajo fosforilando proteínas concretas (Morgan, 1995; Pines, 1995). Para el resto de CDKs no se conoce claramente su papel en la progresión normal del ciclo (Rickert *et al.*, 1996). Las proteínas activadoras de las CDKs son las ciclinas, cuya expresión varía durante el ciclo celular de forma cíclica (Figura 2). Las diferentes ciclinas que se requieren en las fases del ciclo celular son las Ciclinas D (D1, D2 y D3), que se unen a CDK4 y CDK6. Los complejos CDK 4/6-Ciclina D son necesarios para entrar en G1 (Sherr, 1994). La Ciclina E que se asocia con la CDK2, regula la progresión del ciclo de G1 a la fase S (Ohtsubo *et al.*, 1995). La

Ciclina A se une a CDK2 durante la fase S (Figura 2) (Girard *et al.*, 1991; Walker y Maller, 1991). En la fase G₂ tardía la Ciclina A forma complejo con CDK1 promoviendo a la célula a entrar en mitosis, una vez en la fase M ésta es regulada por el complejo Ciclina B-CDK1 (Figura 2) (Arellano y Moreno, 1997; King *et al.*, 1994). Experimentos llevados a cabo en ratones han demostrado que CDK1 es suficiente e indispensable para la división celular (Santamaria *et al.*, 2007). La regulación de las CDKs está mediada, además de por su unión a las ciclinas (Jeffrey *et al.*, 1995; Paulovich y Hartwell, 1995). Las proteínas inhibidoras del ciclo, llamadas inhibidores de CDKs (CKI), también regulan la actividad de las CDKs uniéndose a las CDKs o a los complejos Ciclina-CDK, regulando así su actividad (Vermeulen *et al.*, 2003).

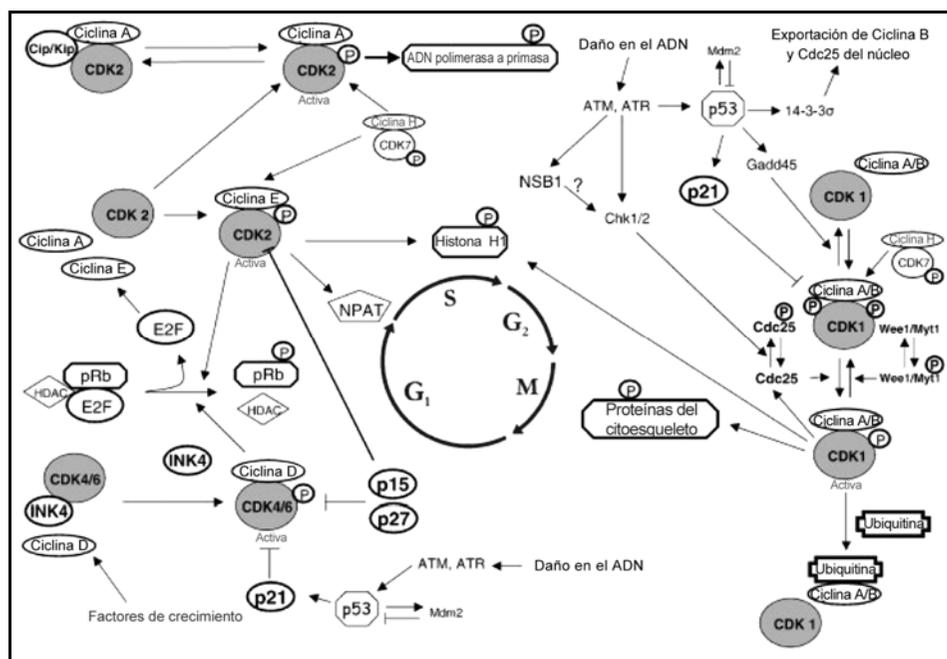


Figura 2. Regulación del ciclo celular. La progresión del ciclo está regulada mediante los complejos Ciclina- CDK y las familias de inhibidores de CDK, INK4 y CIP-KIP (Vermeulen *et al.*, 2003)

1.2.1.1 Familia CIP/KIP

La familia de CKIs CIP/KIP se compone de tres miembros: p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, y p57^{KIP2}. Estas proteínas se asocian con las quinasas CDK4-6/D y CDK2/E-A con efectos diferentes (Sherr y Roberts, 1999). Cuando los complejos CDK4-6/D son muy abundantes las proteínas CIP/KIP contribuyen a la activación de las quinasas CDK2 (Cheng *et al.*, 1999). Por otro lado, cuando los complejos CDK4-6/D son escasos o las proteínas CIP/KIP están en exceso, éstas inhiben las actividades Ciclina D dependiente o se unen a las quinasas CDK2/E-A produciendo la parada del ciclo celular (Kato *et al.*, 1994).

La primera CKI identificada fue p21^{CIP1}. Se describió como una proteína asociada a CDK2 y como un inhibidor del crecimiento en células senescentes (Harper *et al.*, 1993; Noda *et al.*, 1994). La regulación de p21^{CIP1} se da principalmente a nivel transcripcional, aunque la estabilidad del ARNm también es importante (Gartel y Tyner, 1999; Macleod *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000). La proteína p21^{CIP1} está implicada en la parada del ciclo celular en G1 mediado por p53. Cuando se produce daño en el ADN los niveles de p21^{CIP1} aumentan en células salvajes, mientras que esto no ocurre en aquellas células que tienen p53 mutada (el-Deiry *et al.*, 1994; el-Deiry *et al.*, 1993). Además de asociarse a los complejos ciclina-CDK, p21^{CIP1} también se asocia con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), un mecanismo adicional mediante el cual p21^{CIP1} inhibe la síntesis de ADN (Luo *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1993).

La proteína p27^{KIP1} fue identificada como un inhibidor de la actividad CDK2 detectada en células inhibidas por contacto o tratadas con el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) (Koff *et al.*, 1993; Polyak *et al.*, 1994a; Polyak *et al.*, 1994b). También se ha descrito como una proteína de interacción con el complejo Ciclina D/CDK4 (Toyoshima y Hunter, 1994). La regulación de p27^{KIP1} es compleja y se da a varios niveles: transcripcional, traduccional, proteolítica y por su localización (Hengst y Reed, 1996; Kolluri *et al.*, 1999; Millard *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1995; Soucek *et al.*, 1998).

Existen una gran cantidad de estudios que muestran que las señales antimitógenas inducen el cúmulo de p27^{KIP1}, como la inhibición por contacto, TGFβ, cAMP o los tratamientos con rapamicina o lovastatina (Hengst y Reed,

1996). Todas estas evidencias indican que p27^{KIP1} juega un papel importante en la decisión celular de seguir con el ciclo de división, aunque no es la única vía mediante la cual la célula toma esta decisión.

p57^{KIP2} se descubrió como homólogo de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} (Lee *et al.*, 1995), pero a diferencia de los otros inhibidores, su locus tiene impronta genética y sólo se expresa el alelo materno (Hatada y Mukai, 1995). La disrupción del gen de p57^{KIP2} ha demostrado que esta proteína tiene un importante papel en el control de decisiones celulares como diferenciación y apoptosis en algunos tejidos como el tejido óseo o renal (Yan *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997)

1.2.1.2.La familia INK4

La familia INK4 está formada por 4 proteínas que inhiben principalmente a CDK4: p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d} (Chan *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 1994; Hannon y Beach, 1994; Serrano *et al.*, 1993). Todas estas proteínas tienen la capacidad de inhibir la actividad quinasa asociada a las Ciclinas D (Parry *et al.*, 1995; Parry *et al.*, 1999), por tanto su acción inhibitoria es altamente dependiente de la presencia de la proteína del Retinoblastoma (pRb) en la célula. En ausencia de pRb se incrementa la expresión de la Ciclina E y la inhibición de los complejos Ciclina D-CDK4 no evita la entrada en la fase S (Koh *et al.*, 1995).

Las proteínas INK4 se expresan de manera dependiente del tejido y su regulación es aún desconocida, excepto para p15Ink4b, que es inducida por TGFβ (Hannon y Beach, 1994).

De todos los CKIs, tanto de la familia CIP/KIP como de la INK4, sólo p16^{INK4a} está clasificado como un gen supresor de tumores (Ruas y Peters, 1998), ya que las mutaciones en su locus y la pérdida de heterocigosis correlacionan con el desarrollo de melanoma (Kamb *et al.*, 1994).

1.2.1.3.pRb/E2F

Los complejos Ciclina D/CDK 4 y 6 y Ciclina E/CDK2 promueven la entrada a la fase S debido a su capacidad de fosforilar pRb, liberando así el factor de transcripción E2F del complejo represor pRb-E2F (Lundberg y Weinberg, 1998; Yamasaki, 1998) (Figura 3).

Los genes diana de E2F, que son inducidos como consecuencia de la separación de pRb-E2F, incluyen algunas enzimas que participan en la síntesis del ADN como la dihidrofolatoreductasa (DHFR), protooncogenes como BCL2, y algunas proteínas reguladoras del ciclo como la Ciclina E (Ishida *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001; Ohtani *et al.*, 1995). En ocasiones la expresión de Ciclina E puede ser sustituir la expresión de Ciclina D1 (Geng *et al.*, 1999). En este sentido, pRb y las CDKs asociadas a Ciclina E pueden formar un bucle que refuerza el paso de las células a la fase S. Una vez se fosforila pRb, E2F se libera y aumentan los niveles de ARNm de la Ciclina E. Este incremento resulta en un aumento de la actividad del complejo Ciclina E-CDK2 y de la hiperfosforilación de pRb que refuerza la entrada en el ciclo.

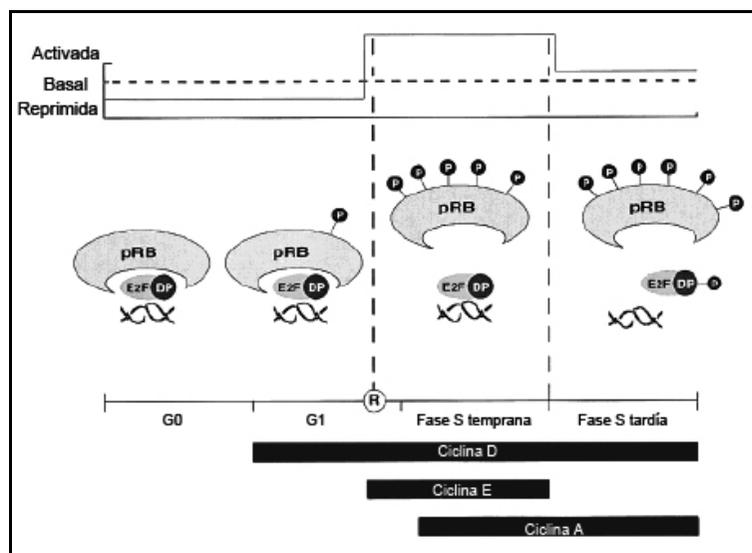


Figura 3. La interacción de pRb y E2F está regulada por fosforilación. pRb está hipofosforilada y unida a E2F en la fase del ciclo G0/G1. En la fase G1 tardía, pRb es hiperfosforilada, dejando libre a E2F. A mayor fosforilación de pRb, mayor liberación de E2F activo. En la fase S, se fosforila un residuo de la subunidad DP que neutraliza la capacidad de unión de E2F/DP al ADN. Adaptada de (Kaelin, 1999)

La hiperfosforilación de pRb puede ser mantenida durante el ciclo celular mediante el complejo Ciclina A-CDK2. El reinicio del complejo pRb-E2F se da en la fase M mediante la defosforilación de pRb, llevada a cabo seguramente por la fosfatasa PP-1 (Durfee *et al.*, 1993). Hay otras dos proteínas, p130 (pRb2) y p107, miembros de la familia de genes "Pocket pRb", que comparten propiedades estructurales y funcionales e interactúan con un gran número de proteínas celulares (Ewen, 1998; Mulligan y Jacks, 1998). pRb, p107 y p130 se unen y modulan la actividad de los factores de transcripción E2F interactuando con las histonas desacetilasas, lo que sugiere que también pueden regular la transcripción alterando la estructura de la cromatina y la disponibilidad de E2F (Ferreira *et al.*, 1998). pRb tiene preferencia por E2F1, 2, 3 o 4 mientras que p107 y p130 parecen asociadas a E2F4 y E2F5 (Yamasaki, 1998). Muchos de estos complejos están regulados de manera específica en cada fase del ciclo, por ejemplo el complejo p130-E2F, se encuentra en células que están en quiescencia y p107-E2F se encuentra en células en fase S (Moberg *et al.*, 1996).

1.3. Principales vías de señalización reguladoras de la proliferación celular

1.3.1. Receptores Tirosín-quinasa (RTKs)

Desde el descubrimiento del primer Receptor Tirosín-Quinasa (RTK), muchos de los miembros de esta familia de receptores de la superficie celular han emergido como claves reguladoras de muchos procesos celulares, como proliferación, diferenciación, supervivencia celular, metabolismo, migración celular y control del ciclo celular (Blume-Jensen y Hunter, 2001; Ullrich y Schlessinger, 1990). Se conocen 58 RTKs en humanos, distribuidos en 20 familias. Todos los RTKs tienen una arquitectura parecida, con un dominio de unión a ligando en la región extracelular, una hélice transmembrana simple y una región citoplasmática que contiene el dominio con actividad tirosín quinasa más una región reguladora C-terminal y una región reguladora de yuxtamembrana. La topología de los RTKs, su mecanismo de activación y los componentes que participan en las vías de señalización intracelulares que los RTKs provocan están altamente conservados evolutivamente (Lemmon y Schlessinger, 2010).

En general los RTKs son activados mediante factores de crecimiento que provocan su dimerización (Ullrich y Schlessinger, 1990), aunque algunos RTKs pueden formar oligómeros en ausencia de ligandos, como es el caso de IGFR1 (Insulin Growth factor Receptor 1) que se expresa en la membrana celular como un dímero (Ward *et al.*, 2007). El estado inactivo de los RTKs puede ser monomérico u oligomérico, siendo necesaria la unión del ligando para su activación (Kossiakoff y De Vos, 1998).

1.3.1.1. Receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR)

El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), es una glicoproteína transmembrana de 170 KDa que pertenece a la familia de receptores RTK de tipo I o receptores ErbB. Esta familia está compuesta por cuatro receptores EGFR (ErbB1/HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Cada uno de estos receptores está compuesto por el dominio de unión al ligando, el de transmembrana y el dominio catalítico anteriormente mencionados.

El dominio extracelular consiste en cuatro subdominios, dos homólogos largos llamados I y III, y dos dominios ricos en cisteínas llamados II y IV. El dominio extracelular del receptor inactivo tiene una estructura dinámica que puede estar cerrada y tener una baja afinidad por el ligando, o una conformación abierta en la que muestra una alta afinidad por el ligando (Figura 4) (Ferguson, 2004).

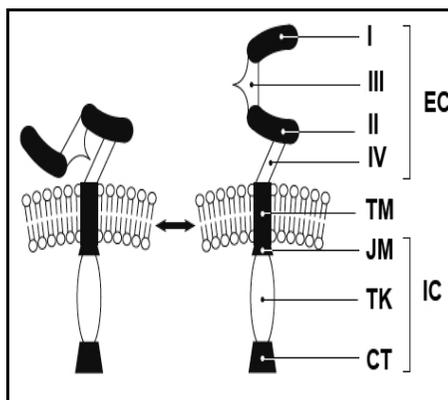


Figura 4. Estructura del EGFR. El dominio extracelular (EC) consta de cuatro subdominios (I, II, III, IV) y puede presentar dos conformaciones que se encuentran en equilibrio: cerrada (baja afinidad, izquierda) o abierta (alta afinidad, derecha). El dominio EC. El dominio transmembrana (TM) va seguido de el dominio intracelular que consta de una región de yuxtamembrana (JM), una región tirosín quinasa (TK) y un dominio Carboxiterminal (CT) responsable del reclutamiento y la fosforilación de las proteínas de las vías activadas por EGFR. *Adaptado de (Oliveira et al., 2006)*

Estas dos conformaciones están en equilibrio. En la forma cerrada la región II está en contacto con el subdominio IV, mientras que en la conformación abierta, la región II tiene una localización diferente y expone un segmento particular denominado brazo de dimerización. En esta conformación de alta afinidad los subdominios I y II están implicados en la unión del ligando al receptor.

El dominio IV probablemente también está implicado en la localización de EGFR en las *caveolas/lipid rafts* de la membrana plasmática. Este dominio CT es rico en residuos de tirosina que modulan las señales mediadas por EGFR después de la fosforilación. En este extremo también se encuentran residuos de treonina y serina que parecen estar implicados en los procesos de desactivación del receptor así como en su endocitosis (Nair, 2005).

La activación de EGFR se lleva a cabo cuando alguno de sus ligandos como el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfiregulina, betacelulina o epiregulina se une al receptor que presenta su conformación abierta (Ferguson, 2004; Yarden, 2001). Esta disposición espacial específica de los subdominios permite la unión del ligando entre I y II y expone el brazo de dimerización posibilitando la formación de homo o heterodímeros mediante la interacción con otros miembros de la familia ErbB. La dimerización inducida por el ligando, es responsable de la transfosforilación en el dominio CT, que recluta proteínas con señales SH2 y PTB. Estas proteínas fosforilan sustratos intracelulares y activan numerosas cascadas de señalización. Las rutas de señalización más conocidas son: MAPK, PI3K/Akt, STAT y PLC γ . Cada una de estas vías activará la expresión de multitud de genes e inducirá respuestas celulares como proliferación, diferenciación, invasión, migración, adhesión, supervivencia y reparación celular (Nair, 2005) (Figura 5). El complejo ligando-EGFR internalizado puede ser degradado o reciclado dependiendo de su estabilidad y de la presencia de la ubiquitin ligasa Cbl, la cual marca el complejo para su degradación mediante el proteasoma (Dikic, 2003; Yarden, 2001).

1.3.1.2. EGFR y cáncer

Los procesos desencadenados por la activación de EGFR, son vitales para las células sanas, pero también tienen una alta relevancia en las células tumorales.

Desde hace años se vienen proponiendo terapias antitumorales con EGFR como diana (Mendelsohn y Baselga, 2003). Actualmente existen numerosas evidencias que revelan la importancia de EGFR en la carcinogénesis:

- EGFR se encuentra sobreexpresado en numerosos casos de tumores humanos, como cabeza y cuello, mama, pulmón, glioblastoma, tiroides, colorectal, próstata y ovario entre otros (Uberall *et al.*, 2008).
- La expresión de EGFR se correlaciona con una baja respuesta a los tratamientos antitumorales, una rápida progresión de los tumores y una baja supervivencia (Baselga, 2002).
- La producción de ligandos como EGF y TGF α se encuentra a menudo incrementada en las células tumorales en las que los receptores están sobreexpresados (Oliveira *et al.*, 2006).
- Los estudios con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti EGFR, parecen inhibir el crecimiento de las células tumorales (Gill *et al.*, 1984; Kawamoto *et al.*, 1983; Sato *et al.*, 1983).

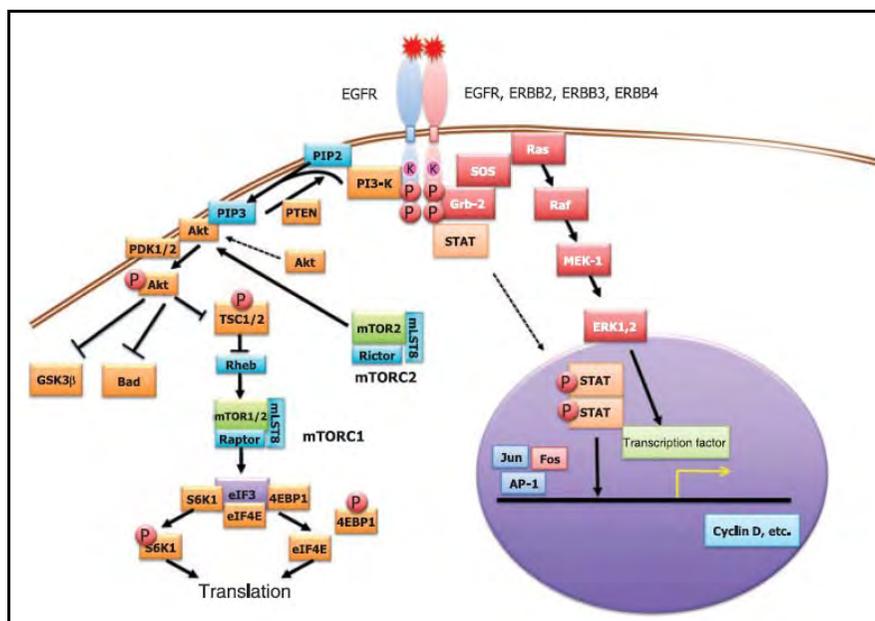


Figura 5. EGFR y vías de señalización Las vías de señalización mediadas por EGFR son complejas. EGFR afecta a diferentes vías de receptores y ligandos, enzimas, proteínas adaptadoras, mensajeros secundarios y factores de transcripción que se encuentran por debajo de la superficie celular. La activación de EGFR influye en una amplia variedad de respuestas que en muchos casos implica un estímulo del crecimiento celular (Mitsudomi y Yatabe, 2010).

1.3.2. Vía de las quinasas activadas por mitógenos

Las vías mediadas por las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) están altamente conservadas evolutivamente, y unen la maquinaria que controla procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis (Steelman *et al.*, 2004). Las vías de las MAPKs están compuestas por módulos de tres quinasas que se modulan cuando la MAPKKK fosforila a la MAPKK que a su vez activa a la MAPK fosforilándola (Figura 6).

Se han identificado tres familias principales de MAPKs en mamíferos, agrupadas por su estructura y función: quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), p38 MAPK y las quinasas N-terminales c-Jun (JNKs); (Chang y Karin, 2001; McDonald *et al.*, 2000; Schaeffer y Weber, 1999; Zhao *et al.*, 1999)

Las respuestas de las MAPKs abarcan un amplio rango de cambios extracelulares e intracelulares (Figura 6). Las interacciones acopladas entre los componentes de la cascada regulan la especificidad y la eficiencia de la transducción de señal de las MAPK.

Se han descrito un gran número de MAP3Ks que pueden activar un número limitado de MAP2Ks, las cuales activan a una MAPK específica (Figura 6). Se cree que la interacción MAP3K-MAP2K es uno de los mecanismos que contribuyen a la especificidad en la señalización celular (Tatebayashi *et al.*, 2003). Esta interacción se da mediante el dominio de acoplamiento versátil (DVD) que se encuentra en el extremo C-terminal de las MAP2K después del dominio quinasa (Takekawa *et al.*, 2005). Una vez activada la MAP2K, contacta con su correspondiente MAPK fosforilándola a través de un motivo de acoplamiento llamado Dominio D o motivo DEJL, que también contribuye junto a DVD a la especificidad de la señal (Holland y Cooper, 1999).

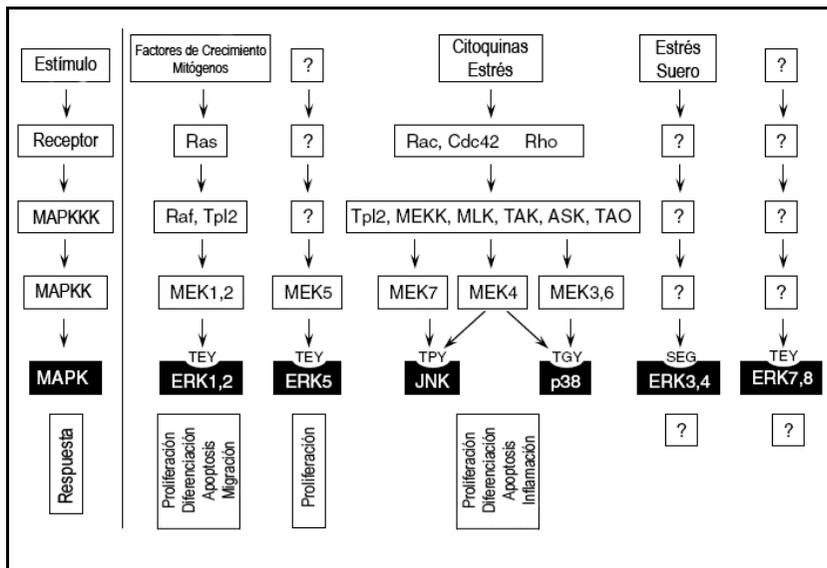


Figura 6. Vías de transducción de señal y respuestas desencadenadas por las MAPKs. Modificado de (Dhillon *et al.*, 2007)

1.3.2.1.RAS

En humanos, existen tres genes que codifican 4 proteínas RAS diferentes, aunque muy homólogas entre sí: HRAS, NRAS, KRAS 4A y KRAS 4B. Las proteínas RAS actúan como transductores de señal que se acoplan a los receptores de membrana o como efectores de vías de señalización intracelulares, intercambiando su conformación activa o inactiva que le confiere su unión a GTP o GDP respectivamente. Bajo condiciones fisiológicas esta unión está regulada por los factores GEFs (Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina), que promueven la activación de RAS y por las proteínas GAPs (Proteínas activadoras de GTPasa), que aceleran la hidrólisis del GTP. La actividad inactivadora de RAS mediante las GAPs es la diana predominante de muchas mutaciones somáticas encontradas en las variantes oncogénicas de los alelos de RAS (Scheffzek *et al.*, 1997).

RAS activa varias de vías de señalización incluyendo Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt y RalEGF/Ral (Peyssonnaud *et al.*, 2000). Las diferentes proteínas Ras tienen diferente potencial para activar las cascadas de señalización, por ejemplo K-Ras induce de forma más contundente la cascada Raf/MEK/ERK, mientras que H-Ras induce de forma más eficiente la cascada PI3K/Akt (Peyssonnaud *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 1998). Después de la unión de citoquinas, factores de crecimiento o mitógenos a sus respectivos receptores, se activa el complejo acoplador Shc/Grb2/SOS, es entonces cuando la proteína RAS inactiva cambia GDP por GTP, provocando un cambio conformacional, volviéndose activa y reclutando a Raf en la membrana celular, desencadenando diferentes respuestas celulares.

1.3.2.2.RAF

El gen *Raf* en mamíferos codifica por tres proteínas: A-Raf, B-Raf y Raf-1 (C-Raf). Raf es una serina-treonina quinasa que es activada normalmente por una serie de eventos que incluyen: el reclutamiento de Raf a la membrana celular mediado por RAS, la dimerización de proteínas Raf, la fosforilación-defosforilación de los diferentes dominios, la disociación de la proteína quinasa inhibidora de Raf y la asociación con complejos acopladores como por ejemplo la quinasa supresora de Raf (RKIP) (Blalock *et al.*, 1999; Chang y Karin, 2001; Dhillon *et al.*, 2002; Fabian *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1998; Yeung *et al.*, 1999). La actividad de

Raf también está modulada por chaperonas, incluidas Bag1, 14-3-3 y la proteína de Choque térmico 90 (Hsp90) (Blagosklonny, 2002; Fantl *et al.*, 1994).

Raf-1 contiene al menos trece lugares de fosforilación reguladores (Steelman *et al.*, 2004). Muchos de estos, como por ejemplo S43, S259 y S621, están fosforilados cuando Raf-1 es inactiva, lo que permite a 14-3-3 unirse a Raf-1. Después de un estímulo celular, S621 es defosforilado transitoriamente por una fosfatasa no identificada y 14-3-3 se disocia de Raf-1 permitiendo así que Raf-1 pueda ser fosforilada en S338, Y340 y Y341, activándose. Las quinasas de la familia Src llevan a cabo estas fosforilaciones (Marais *et al.*, 1997).

1.3.2.3. MEK y ERK

La proteína MEK1 (*Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*), es una tirosín y serín-treonín quinasa (Alessi *et al.*, 1994) y su actividad se regula positivamente cuando Raf la fosforila en residuos serina de su dominio catalítico. Los tres miembros de la familia Raf son capaces de fosforilar y activar a MEK, aunque lo hacen con mayor o menor potencia (B-Raf>Raf-1>>A-Raf) (Alessi *et al.*, 1994). Su diana predominante corriente abajo es ERK, mientras que ERK tiene múltiples dianas.

Las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1 y 2) son serín treonín quinasas y su actividad se regula positivamente mediante la fosforilación mediada por MEK1 y MEK2. Cuando MEK activa ERK, ésta fosforila numerosas dianas citoplasmáticas y nucleares, incluyendo quinasas, fosfatasa, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto (Yoon and Seger, 2006). La señalización por ERK, dependiendo del tipo celular y de su localización celular puede regular diversos procesos como proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, angiogénesis y remodelación de la cromatina (Dunn *et al.*, 2005; Yoon and Seger, 2006, Murphy and Blenis, 2006).

Las proteínas ERK pueden fosforilar directamente diferentes factores de transcripción incluyendo Ets-1, c-Jun, c-Myc y Elk-1. ERK también puede fosforilar y activar p90Rsk (ribosomal S6 kinase), la cual lidera la activación del factor de transcripción CREB (Steelman *et al.*, 2004). Además mediante mecanismos indirectos, ERK puede activar el factor nuclear kappa B (NF-kB) mediante

fosforilación y activar la proteína inhibidora quinasa kappa B (IKK) (Zhao y Lee, 1999). Una acción sostenida de ERK promueve la fosforilación y la estabilización de varios genes que promueven la entrada al ciclo celular, como la Ciclina D1, también puede reprimir la expresión de genes que inhiben la proliferación (Yamamoto et al., 2006). Estos son solo algunos ejemplos de dianas de ERK 1,2, ya que se conocen más de 160.

1.3.2.4. MAPKs y cáncer

En 1982, se describió por primera vez una mutación puntual en un alelo de HRAS, que le confería diferencias funcionales como oncogén en 1982 en carcinoma de vejiga (Reddy *et al.*, 1982). Posteriormente se han descrito multitud de mutaciones en diferentes tipos de cáncer humano. No todas las mutaciones de RAS se originan en la misma proporción, las mutaciones más comunes se dan en las posiciones G12, G13 y Q61 de HRAS, NRAS y KRAS. No se han podido correlacionar las mutaciones específicas de RAS con la agresividad de la patología, aunque se han descrito casos en cáncer de pulmón y colorectales en los que se ha asociado una mutación concreta con una peor prognosis (Andreyev *et al.*, 1998; Keohavong *et al.*, 1996; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011; Stirewalt *et al.*, 2001). También se ha observado especificidad en la isoforma mutada en diferentes tipos de cáncer (Karnoub y Weinberg, 2008). Así, por ejemplo, las mutaciones en KRAS se detectan más frecuentemente en tumores colorectales, carcinomas de pulmón y pancreáticos, las mutaciones en HRAS están asociadas con cáncer de piel y de cabeza y cuello y NRAS se encuentra mutado con más frecuencia en cáncer de tipo hematopoyético (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011; Sanger).

Se han encontrado mutaciones en B-Raf en un 60% de melanomas malignos (Davies *et al.*, 2002), y frecuencias más bajas en otros tumores humanos como cáncer de colon, de tiroides o de ovario. La mutación más común (90%) se produce en el bucle de activación lo que provoca una activación constitutiva de B-Raf (Wan *et al.*, 2004). Aunque algunas mutaciones en B-Raf no elevan su actividad, son capaces de activar la señalización vía MEK-ERK. Esto se debería a que B-Raf podría heterodimerizar con Raf-1 provocando así la activación de ERK (Rushworth *et al.*, 2006). Por el contrario las mutaciones en Raf-1 son raras. Se

han encontrado cuatro tipos de mutaciones en Raf-1 y sólo una de ellas aumenta la actividad quinasa (Emuss *et al.*, 2005)

1.3.3. Vía PTEN/PI3K/Akt

Las proteínas PI3Ks, constituyen una familia de quinasas lipídicas que se caracterizan por su capacidad de fosforilar el grupo 3'-OH del anillo inositol de los fosfatidil-inositoles (Fruman *et al.*, 1998). La familia PI3K se divide en cuatro clases: tres de ellas fosforilan lípidos, mientras que la clase IV de quinasas (mTOR, ATM, ATR y DNA-PK) fosforilan proteínas. La clase I consta de quinasas heterodiméricas compuestas de una unidad catalítica (p110 α , β , γ y δ) y una subunidad reguladora. A su vez la clase I está subdividida en dos subclases, la subclase Ia, activada por RTKs y está formada por la combinación de p110 α , β , o δ y la subunidad reguladora (p85, p65 o p55), y la subclase Ib, la cual es activada por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y está formada por p110 γ y la subunidad reguladora p101.

La activación de PI3K es inducida por factores de crecimiento e insulina que median la localización de la subunidad catalítica en la membrana, donde se encuentra su sustrato, el fosfatidilinositol difosfato (PIP2). La activación de los RTKs, da como resultado la asociación de PI3K con el receptor a través de los dominios SH2, lo que activa la subunidad catalítica (Hunter, 2000). La activación de PI3K conduce a la formación de PI-3,4,5-P3 en pocos segundos. Los efectos del PIP3 en las células están mediados por una unión específica a dominios de unión proteína-lípido llamados FYVE y dominios de homología a pleckstrina (PH) (Pawson y Nash, 2000). Las proteínas que contienen este dominio son mediadores críticos para las señales inducidas por la clase PI3K-IA, y se encuentran en varias proteínas incluyendo a PDK1 y Akt, ambas con un papel central en los efectos carcinogénicos producidos por la desregulación de la actividad de PI3K.

Cuando PDK1 es activada por PIP3, fosforila Akt en el residuo Thr 308, activando su actividad Serin/treonin quinasa. Una vez fosforilada en Thr 308, la total activación viene dada por la fosforilación en el residuo Ser 473 (Alessi *et al.*, 1996) mediante PDK2 (el complejo rictor/mTOR o DNA-PK). En un paso posterior, Akt

activa se transloca a través de un mecanismo no conocido al núcleo donde se encuentran algunos de sus sustratos (Meier y Hemmings, 1999). La activación de Akt, estimula la progresión en el ciclo celular, la supervivencia, el metabolismo y la migración a través de la fosforilación de muchos sustratos fisiológicos (Dahia, 2000; Downward, 2004; Kandel y Hay, 1999; Stokoe, 2001; Vivanco y Sawyers, 2002).

Akt es la serina–treonina quinasa corriente abajo de PTEN/PI3K. La familia Akt consta de tres miembros Akt1, Akt2 y Akt3 (Murthy *et al.*, 2000), que están codificados por tres genes diferentes (Datta *et al.*, 1999). Akt se expresa de manera ubicua pero sus niveles de expresión dependen del tipo tisular. La familia Akt contiene el dominio PH que se une a fosfolípidos, siendo así regulada por PI3K, la cual recluta a Akt en la membrana celular mediante la unión a PIP3, permitiendo su activación mediante PDK1 (Figura 7) (Kandel y Hay, 1999).

1.3.3.1. Vía PI3K/Akt y progresión del ciclo celular

Las dianas de Akt, son proteínas implicadas en el metabolismo del glicógeno como la quinasa glicógeno sintasa fosfodiesterasa 3 β (GSK3 β) o en el ciclo celular como los inhibidores de CDKs: p21^{CIP1} y p27^{KIP1} (Blume-Jensen y Hunter, 2001).

Uno de los mecanismos claves para la modulación mediante Akt de sustratos específicos como β -catenina, p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, mdm2 o los factores de transcripción Forkhead, tiene que ver con la regulación de su localización, citoplasmática o nuclear, mediante fosforilación. Akt fosforila p21^{CIP1} e inhibe su efecto antiproliferativo reteniéndola en el citoplasma, así como a p27^{KIP1} (Liang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002; Viglietto *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001).

Además, Akt juega un papel importante en la fisiología y la patología de la angiogénesis mediante su efecto en las células endoteliales y las células que producen señales angiogénicas, como las células tumorales. La vía de PI3K/Akt está fuertemente activada por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) promoviendo la supervivencia de las células endoteliales, el crecimiento y la proliferación (Olsson *et al.*, 2006). Akt induce diferentes mecanismos de supervivencia como la inactivación mediante fosforilación de los factores proapoptóticos Bad y procaspasa-9 así como la inhibición de los factores de

transcripción de la familia Forkhead que inducen la expresión de factores proapoptóticos como el ligando de Fas (FasL) (Plas y Thompson, 2005).

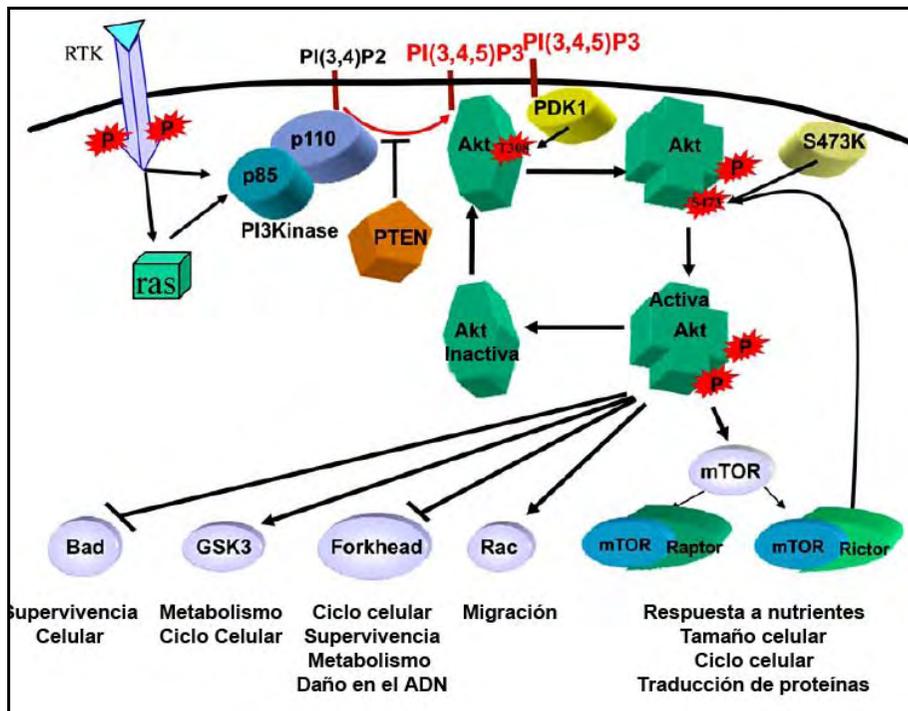


Figura 7. Esquema general de la vía PI3K/Akt. La vía PI3K/Akt induce numerosas respuesta celulares regulando procesos como la supervivencia celular, el metabolismo o la modulación del ciclo celular. Modificado de Carnero, 2010.

1.3.3.2. PI3K/Akt y cáncer

La vía PTEN/PI3K/Akt aparece frecuentemente alterada en diferentes tipos de cáncer. La proteína homóloga fosfatasa y tensina (PTEN) es una proteína-lípido fosfatasa cuya principal diana es el lípido fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el producto de la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K) (Maehama y Dixon, 1998). La pérdida de función de PTEN, así como la activación de PI3K, resulta en un acúmulo de PIP3 que activa efectores corriente abajo incluyendo a la quinasa dependiente de fosfatidilinositol 3 (PDK1), Akt y Rac1/cdc42.

La actividad de PTEN se encuentra afectada en mutaciones, deleciones o metilaciones que implican el silenciamiento de su promotor, tienen una alta frecuencia en muchos tumores primarios y metástasis (Parsons *et al.*, 2005; Vivanco y Sawyers, 2002). Recientemente se han encontrado mutaciones activadoras en el gen PI3KA (que codifica para la subunidad catalítica p110 α) en tumores humanos (Samuels *et al.*, 2004). Las mutaciones observadas más frecuentemente aumentan la capacidad catalítica de PI3K, induciendo la activación constitutiva de Akt (Kang *et al.*, 2005).

No se han encontrado modificaciones o mutaciones en el gen que codifica por Akt de mamíferos, aunque varios estudios han encontrado amplificaciones en cánceres humanos, como la de Akt1 en cánceres gástricos, y de Akt2 en cáncer de ovario, páncreas, mama y estómago (Bellacosa *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1996), además de alguna mutación puntual en la región de unión a lípidos de Akt1 en tumores de mama, colorectales y de ovario que la localiza en la membrana plasmática estimulando la señalización corriente abajo (Carpten *et al.*, 2007). Más allá de las mutaciones en los componentes de la vía PI3K/Akt, esta cascada puede ser activada por otros estímulos. Esta activación puede ser independiente de receptor, como en el caso de las células que expresan constitutivamente RAS (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997) o por receptores que están sobreexpresados o permanentemente activos en muchos tipos de cáncer humano. Este último caso es característico en algunos tumores que presentan activación constitutiva de ErbB2, los cuales muestran actividad constitutiva de Akt (Blume-Jensen y Hunter, 2001; Zhou *et al.*, 2000).

1.3.4. Factores de transcripción FoxO

Las proteínas Forkhead, son factores de transcripción que se caracterizan por tener un dominio de unión al ADN, la caja forkhead, conservada en invertebrados y mamíferos (Greer y Brunet, 2005). Los genes Forkhead se agrupan en 19 subclases de genes Fox (Kaestner *et al.*, 2000). Los factores de transcripción Forkhead O es uno de los subgrupos. La subfamilia FoxO consta de cuatro miembros en mamíferos (FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6) (Greer y Brunet, 2005), los cuales activan o reprimen genes como Bim y FasL, involucrados en apoptosis, p27^{KIP} y Ciclina D, implicados en la regulación del ciclo celular, así como

GADD45a en la reparación del ADN, la Manganeseo superóxido dismutasa (MnSOD) de respuesta al estrés y G6Pasa (glucosa-6-fosfatasa) implicada en el metabolismo (Dijkers *et al.*, 2000; Finnberg y El-Deiry, 2004; Schmidt *et al.*, 2002) (Figura 8).

1.3.4.1. Factores FoxO y progresión del ciclo celular

Una de las primeras funciones descritas para las proteínas FoxO de mamíferos fue su capacidad de regular la transición G1/S (Dijkers *et al.*, 2000; Medema *et al.*, 2000). Esta transición depende de la activación de los factores de transcripción E2F la hiperfosforilación secuencial de la familia de proteínas pRb mediada por las Ciclinas D (Sherr, 1996). La actividad nuclear de FoxO1 o FoxO3a induce el arresto celular en G1 reprimiendo la actividad de CDK4 (Ramaswamy *et al.*, 2002), por otra parte la expresión ectópica de Ciclina D1 puede revertir parcialmente esta parada en el ciclo celular inducida por FoxO, por lo que se sospecha que FoxO podría regular de alguna forma la actividad de la Ciclina D (Schmidt *et al.*, 2002). Por el momento, no hay ninguna evidencia de que FoxO se una a los promotores de la Ciclina D y suprima su expresión, sí pueden hacerlo indirectamente aumentando la expresión de represores de su transcripción como Bcl-6, un conocido represor transcripcional del gen de la Ciclina D2 (Fernandez de Mattos *et al.*, 2004). FoxO también regula la transición G1/S del ciclo aumentando la tasa de transcripción de los CKIs. Los factores FoxO inducen incrementos en la transcripción de los miembros de la familia CIP/KIP p21^{CIP1} y p27^{KIP1} y además pueden inhibir la actividad de los complejos CDK-Ciclina A/E/D (Medema *et al.*, 2000; Seoane *et al.*, 2004). También se ha demostrado que los inhibidores específicos de CDK4/6, p15^{INK4b} y p19^{INK4d} también son dianas de FoxO en el arresto del ciclo en G1 (Katayama *et al.*, 2008). Así, la inhibición de Akt mediante inhibidores de PI3K o PDK1 incrementa la expresión de p15^{INK4b} y p19^{INK4d} pero no de p16^{INK4a} y p18^{INK4c}.

FoxO también tiene como diana directa a los miembros de la familia pRb, p107 y p130 (pRb2) (Giacinti y Giordano, 2006; Macaluso *et al.*, 2006). FoxO3a y FoxO4 activan la transcripción de p130, que puede inducir a las células a una parada del ciclo celular y hacerles entrar en un estado quiescente (Kops *et al.*, 2002).

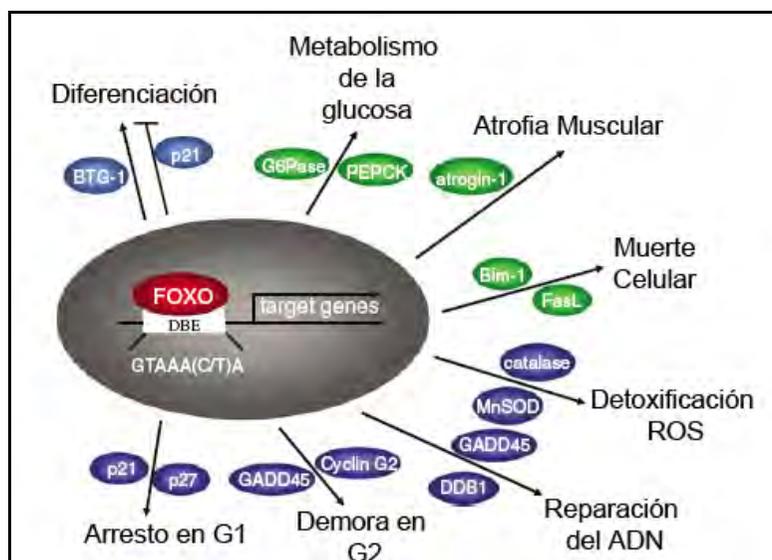


Figura 8. Genes diana de los factores FoxO. Los factores de transcripción FoxO inducen la transcripción de una gran cantidad de genes en las células en división (en azul) y en las células postmitóticas (en verde). Adaptado de (Greer y Brunet, 2005).

1.3.4.2. Regulación de los factores FoxO

Se ha observado que varios factores de crecimiento reducen la expresión y la actividad de los factores FoxO. Durante el desarrollo de tumores la inhibición de la actividad transcripcional de FoxO3a promueve la transformación celular, la progresión tumoral y la angiogénesis (Hu *et al.*, 2004; Potente *et al.*, 2005). Los factores FoxO están regulados por una gran variedad de estímulos externos como EGFR, insulina, neurotrofinas, nutrientes, citoquinas y estrés oxidativo. Estos estímulos controlan la expresión proteica de los factores FoxO, su localización subcelular o la unión al ADN y su actividad transcripcional. Las proteínas FoxO se regulan mediante modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación, ubiquitinación y posiblemente otras modificaciones no identificadas. Se han identificado varias vías que activan los factores FoxO, como la proteína JNK o la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y otras que los inhiben como la vía PI3K/Akt, IKK β y ERK1/2 (Greer *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2004; Plas y Thompson, 2003; Wang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008)

Akt, IKK β y ERK son tres quinasas oncogénicas comunes en tumores humanos que tienen como diana al gen supresor de tumores FOXO3a, al que fosforilan en diferentes aminoácidos en respuesta a factores de crecimiento y a la insulina. La fosforilación de FOXO3a tiene como resultado su traslocación del núcleo al citoplasma y su consiguiente degradación. La fosforilación de FoxO3a mediante Akt en los residuos Thr32, Ser253, and Ser315 en FoxO3 humano, estimula la interacción entre FoxO3a y 14-3-3, que promueve la exportación de FoxO3a del núcleo al citoplasma lo que resulta en una represión de su función transcripcional (Brunet *et al.*, 1999). Estas tres quinasas también estimulan la ubiquitinación que resulta en la degradación de FoxO3a mediante el proteasoma. Además, CDK2 también fosforila a FoxO en varios sitios inhibiendo su actividad y a su vez, Akt y ERK inducen aumentos en la expresión de CDK2 (Lents *et al.*, 2002).

1.3.4.3. Factores FoxO y cáncer

Se ha observado una baja expresión de FoxO en numerosos tipos de tumores como cáncer de mama, próstata, glioblastoma, rhabdomiosarcoma y leucemia (Arden, 2006; Myatt y Lam, 2007). También se sabe que la pérdida de FoxO1a mediante delección de la región 13q14 promueve el cáncer de próstata independiente de andrógenos (Dong *et al.*, 2006). Además se ha observado su localización citoplasmática y regulación a la baja en cáncer de mama (Hu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008). La inactivación de FoxO parece ser un paso importante en la transformación carcinogénica y el incremento de su actividad podría ser una estrategia terapéutica razonable.

1.4. Tipos de muerte celular

Se han descrito varias categorías de muerte celular, las más comunes son: apoptosis, autofagia, necrosis y catástrofe mitótica (Galluzzi *et al.*, 2012). La quiescencia permanente, conocida como senescencia se considera también un tipo de parada del ciclo celular en el contexto de la terapia del cáncer (Dimri, 2005). Estos tipos de muerte celular presentan diferencias moleculares y celulares que se describen en la Tabla 1.

La autofagia y la apoptosis se consideran procesos programados, ya que tienen un estricto control genético (Danial y Korsmeyer, 2004; Lum *et al.*, 2005). La muerte celular programada resulta en una desintegración de los componentes celulares y la eliminación de estos por las células vecinas. Estos procesos se dan normalmente en el remodelaje de los tejidos en el desarrollo de los organismos eucariotas multicelulares y en los organismos adultos con el fin de mantener el tejido normal adulto. La necrosis y la catástrofe mitótica se consideran respuestas pasivas a daños celulares masivos, aunque algunos estudios sugieren que estos procesos también podrían estar bajo un control genético (Castedo *et al.*, 2004; Zong y Thompson, 2006). La senescencia es un proceso desencadenado por la edad, derivado de un programa genético que implica la erosión de los telómeros y la activación de las vías de señalización de supresores de tumores (Smogorzewska y de Lange, 2002). La desregulación de las vías que controlan la muerte celular está relacionada con la carcinogénesis. Se han descrito otros modelos de muerte celular como apoptosis independiente de caspasas, necroptosis, paraptosis, piroptosis y muerte celular lenta, cuya morfología y características bioquímicas varían de las vías mayoritarias de muerte celular (Broker *et al.*, 2005; Fink y Cookson, 2005).

Tabla 1. Categorías y características de los tipos de muerte celular

Cambios Morfológicos	Apoptosis	Autofagia	Necrosis	Senescencia	Catástrofe Mitótica
Membrana celular	Se mantiene la integridad de la membrana. Formación de <i>Blebs</i>	Formación de <i>Blebs</i>	Pérdida de la integridad de la membrana	Aplastamiento, incremento del tamaño	–
Núcleo	Condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y del ADN	Condensación parcial de la cromatina, no hay fragmentación del ADN	Degradación del ADN	Cúmulo de heterocromatina	Segregación de los cromosomas durante la citoquinesis
Citoplasma	Despolimerización del citoesqueleto. Membrana unida a fragmentos celulares	Incremento de vesículas autofágicas, degradación del Golgi, polirribosomas y ER	Tumefacción de los orgánulos celulares	Granulamiento	–
Métodos de detección	Tinción Anexina V, ensayos de fraccionamiento del ADN, activación de caspasas	Localización de LC3	Permeabilidad a tinciones vitales, liberación del contenido intracelular	Actividad de β -Galactosidasa	Visualización de células multinucleadas
Liberación de contenido celular	Lisofosfatidilcolina	–	HMBG1, S100, metabolitos purínicos, proteínas HSP, ácido úrico, HDGF	–	–
Respuesta inmune	Engullición de la carcasa celular	–	Estimulación del crecimiento celular y reparación tisular	–	–

Bleb: Protuberancia irregular que se forma en la membrana plasmática a causa del desacoplamiento del citoesqueleto de la membrana plasmática (Fackler y Grosse, 2008). **LC3:** *light chain 3*. **HMBG1:** *High-mobility group protein B1*. **HSP:** *heat shock protein*. **HDGF:** *hepatoma-derived growth factor*

1.4.1. Apoptosis

El término apoptosis fue usado por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie para diferenciarlo de la muerte por necrosis que se observaba en tejidos que habían padecido algún tipo de daño (Kerr *et al.*, 1972). Las características morfológicas de la apoptosis incluyen: formación de *blebs* (protuberancias de la membrana plasmática), contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación del nucleosoma. En condiciones normales, las células que siguen un proceso apoptótico son reconocidas por los macrófagos o por sus células vecinas, que eliminan sus restos celulares. Existen dos vías de señalización que dirigen a la célula hacia la apoptosis: a) Vía intrínseca o mediada por mitocondrias, b) Vía extrínseca o extracelular (Cory y Adams, 2002; Dimri, 2005; Nagata, 1997).

Ambas vías activan enzimas proteolíticas llamadas caspasas que median el desmantelamiento de los orgánulos celulares y de la arquitectura celular rápidamente. La familia de las caspasas contiene un residuo de cisteína nucleofílico que participa en la rotura de los motivos que contienen ácido aspártico (Thornberry y Lazebnik, 1998). Las caspasas se expresan como precursores inactivos que forman oligómeros activos después de partirse. Hay dos grupos de caspasas: las iniciadoras o apicales (Caspasa 8, 9 y 10) y las efectoras o ejecutoras (Caspasa 3, 6 y 7), lo que sugiere que las iniciadoras tienen capacidad autocatalítica mientras que las efectoras necesitan activación por parte de las iniciadoras.

1.4.1.1. Vía Extrínseca

La vía extrínseca se desencadena por la unión de un ligando a un receptor extracelular en la membrana plasmática

La vía extrínseca es activada mediante los miembros de dos familias de proteínas: la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y por los receptores de sus ligandos (TNFR) (Locksley *et al.*, 2001). Muchos de los miembros de la familia TNF se unen a receptores que activan señales que implican respuestas proinflamatorias y que no señalizan muerte celular. Los ligandos de la familia TNF capaces de inducir apoptosis son TNF- α , FasL, y el receptor del ligando del inductor de apoptosis TNF (TRAIL) (LeBlanc y Ashkenazi, 2003; Peter y Krammer, 2003). Después de la

unión extracelular del ligando, el dominio citoplasmático de TNFR recluta las caspasas iniciadoras. Los receptores de muerte de FasL y TRAIL (DR4 y DR5) reclutan la proteína adaptadora asociada a Fas que contiene un dominio de muerte (FADD) (Chinnaiyan *et al.*, 1995), la cual recluta a las caspasas iniciadoras 8 y 10 formando el complejo señalizador de inducción de muerte (DISC) (Kischkel *et al.*, 1995), lo que provoca la autoproteólisis de las caspasas 8 y 10 (Boatright *et al.*, 2003; Donepudi *et al.*, 2003).

1.4.1.2. Vía intrínseca

La vía intrínseca se activa normalmente en respuesta a señales de estrés intracelular como daño en el ADN, altas concentraciones de ROS (especies reactivas de oxígeno), infecciones virales y activación de oncogenes (Kroemer, 2003).

Los miembros de la familia Bcl-2 regulan el flujo de proteínas apoptóticas desde la mitocondria. Estas proteínas contienen de uno a cuatro dominios con homología a Bcl-2 (BH). El número y la combinación de este tipo de dominios determinan si la proteína será apoptótica o antiapoptótica. Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 contienen 4 dominios e incluyen: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w y Bfl-1/A1. Los miembros proapoptóticos no contienen el dominio BH4 y están divididas en dos grupos: los miembros que contienen solamente el dominio BH3 y las proteínas multidominio BH1-3 Bax y Bak. Las proteínas que solo tienen dominio BH3 incluyen: Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bmf entre otras y son reguladas mediante control transcripcional normalmente por p53 (El-Deiry, 2003). En células murinas la delección de Bax y Bak es suficiente para prevenir la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) inducida por los eventos apoptóticos corriente arriba (Wei *et al.*, 2001). Bax y Bak normalmente se encuentran como monómeros inactivos. Bax reside en el citosol o anclado a las membranas intracelulares (Suzuki *et al.*, 2000) mientras que Bak está unida a Mcl-1, Bcl-xl o al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC-2), en la membrana externa de la mitocondria. El esquema general de la activación de la vía intrínseca es la oligomerización de Bax y Bak en la membrana externa de la mitocondria para activar MOMP, lo cual permite la liberación de factores apoptogénicos como el citocromo C, que una vez liberado, se une al factor activador de proteasas

apoptótico (Apaf-1), que recluta a la procaspasa 9 promoviendo su propia activación. Una vez activada, la caspasa-9, corta a sus efectores, las caspasas 3 y 7 que rápidamente cortan sus sustratos intracelulares. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 bloquean la oligomerización de Bax y Bac o sus asociaciones con proteínas con dominio BH3 previniendo la inducción de MOMP (Cory y Adams, 2002).

1.4.2. Necrosis

Tradicionalmente, la necrosis se refiere a la muerte celular de una forma descontrolada y patológica. Recientes estudios apuntan que la necrosis también sería un evento controlado que podría estar implicado en procesos de desarrollo, fisiológicos y patológicos (Majno y Joris, 1995; Proskuryakov *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2003). La necrosis es inducida por la inhibición de la producción de la energía celular (disminución de los niveles de adenosín trifosfato (ATP)), desregulación del balance del flujo intracelular y extracelular de calcio, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de proteasas no apoptóticas (Haworth y Hunter, 1979). Las células que son muy proliferativas necesitan energía que proviene de la glucólisis, si ésta es inhibida, los niveles de ATP disminuyen. Una forma de inhibir la glucólisis es la hiperactivación de la proteína PoliADP-ribosa polimerasa (PARP) (Ha y Snyder, 1999). Cuando las células se encuentran en un ambiente anaeróbico generan ROS, lo que conlleva al estrés oxidativo, daño de las moléculas intracelulares y de los orgánulos y por último necrosis. Los ROS pueden dañar el ADN rompiendo sus cadenas y oxidando las purinas (Marnett, 2000) y modificar los lípidos, afectando a los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La oxidación lipídica puede desembocar en la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de las membranas intracelulares de los orgánulos (lisosomas y retículo endoplasmático), lo que provocaría un influjo de calcio, un importante inductor de necrosis (Bano *et al.*, 2005; Waring, 2005).

1.4.3. Catástrofe Mitótica

La catástrofe mitótica es un proceso que implica mitosis aberrantes que resultan en una segregación incorrecta de los cromosomas durante la separación de las cromátidas. En general no se considera un mecanismo de muerte, sino una forma

de provocar la muerte de forma irreversible (Weaver y Cleveland, 2005). Las células eucariotas tienen mecanismos muy complejos con los que monitorizar la estructura de los cromosomas y detectar cualquier tipo de daño en el ADN. Esto se traduce en la parada del ciclo celular y en la activación de la maquinaria de reparación del ADN. Si el daño es muy grave se da un bloqueo permanente del ciclo celular (senescencia) o la célula es eliminada mediante mecanismos de muerte. Una definición propuesta recientemente para la catástrofe mitótica es la muerte, que ocurre durante la mitosis y que resulta de la combinación de una deficiencia en los puntos de control del ciclo celular (en especial del control de la estructura del ADN y del punto de control mitótico) y de daño celular (Castedo *et al.*, 2004). Los puntos de control para la estructura del ADN se activan mediante quinasas de la familia PI3K como proteína quinasa ataxia telangiectasia (ATR) y Rad3-relacionada a ATR, que fosforilan las quinasas Chk1 y Chk2, que a su vez fosforilan a una multitud de proteínas implicadas en la señalización del punto de control (Bartek y Lukas, 2003). El punto de control mitótico, previene la anafase (separación de las cromátidas hermanas) hasta que los cromosomas han obtenido su acoplamiento bipolar. El punto de control mitótico es el responsable de la producción de células idénticas genéticamente asegurándose una correcta segregación de los cromosomas. Cuando los cromosomas no están correctamente acoplados al huso mitótico, se generan señales que recibe el punto de control mitótico, el cual evita la separación de las cromátidas hasta que estas no estén ancladas correctamente al huso mitótico. La progresión en la anafase puede prevenirse inhibiendo la activación del complejo de promoción de la anafase (APC). APC es una E3 ubiquitin ligasa que marca los sustratos mitóticos para su destrucción mediada por el proteasoma, lo cual es necesario para que empiece la anafase. Se ha observado que la no segregación de los cromosomas resulta en una muerte celular rápida (Hoyt *et al.*, 1991; Li y Murray, 1991). Morfológicamente, la catástrofe celular está asociada con la formación de células gigantes con dos o más núcleos. Las células con dos núcleos son arrestadas en G1 de forma dependiente de p53. El daño que conlleva a una catástrofe mitótica puede ser inducido por fármacos quimioterápicos que actúen como venenos para los microtúbulos.

1.4.4. Senescencia

La senescencia replicativa fue descrita en el contexto de células normales en cultivos primarios que tenían un número finito de divisiones (Hayflick y Moorhead, 1961). Un mecanismo implicado en la senescencia replicativa es el acortamiento de telómeros (Smogorzewska y de Lange, 2002). Después de cada división celular, los telómeros son acortados, ya que las células adultas no contienen suficiente enzima telomerasa para añadir repeticiones al final de los cromosomas. Cuando el cromosoma se acorta hasta cierto límite, se produce una respuesta de daño al ADN que se traduce en una parada del ciclo celular (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003). Esta respuesta al daño en el ADN puede darse por otros factores que causen estrés a la célula como la exposición a agentes quimioterápicos o a señales oncogénicas y mitóticas que inducen senescencia prematura tanto *in vitro* como *in vivo* (Robles y Adami, 1998; Schmitt *et al.*, 2002; te Poele *et al.*, 2002). Por tanto se ha propuesto que los defectos en la señalización de la senescencia pueden contribuir a la carcinogénesis (Dimri, 2005), así p53 y pRb han sido descritos como los dos principales reguladores de la senescencia (Shay *et al.*, 1991). Las células senescentes son más grandes, aplanadas y a menudo presentan vacuolización. El marcador más usado para la detección de la senescencia es la beta-galactosidasa, la cual se detecta mediante métodos colorimétricos usando como sustrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactopyranoside (X-Gal) a pH 6.0 (Dimri *et al.*, 1995). También se pueden observar los cúmulos de heterocromatina de ADN transcripcional silenciado mediante su tinción y observación bajo el microscopio (Narita *et al.*, 2003).

1.4.5. Autofagia

La autofagia es una vía de degradación lisosomal de material citoplasmático y orgánulos muy conservada evolutivamente y estrictamente regulada (Eskelinen, 2008; Kundu y Thompson, 2008).

La autofagia se activa bajo condiciones de estrés como falta de aminoácidos, proteínas mal plegadas o infecciones virales. Se conocen tres rutas de autofagia (Figura 9):

1. Macroautofagia o autofagia simple: el material citoplasmático que se va a degradar se envuelve en un orgánulo especializado que se fusionará con las vesículas lisosomales y liberará el citoplasma para su degradación (Dunn, 1994).
2. Microautofagia: la membrana lisosomal secuestra una porción del citoplasma (Ahlberg *et al.*, 1982)
3. Autofagia mediada por chaperonas (CMA): las proteínas contienen una secuencia específica por la cual son transportadas del citoplasma al lumen del lisosoma a través de la membrana lisosomal (Cuervo y Dice, 1996).

Después de la inducción mediante una señal de estrés como la privación, el primer paso de la autofagia es la formación de un autofagosoma. Una membrana elongada de la cisterna se envuelve en sí misma llevándose una porción de citoplasma formando una doble membrana que envuelve el fagosoma. Esta cisterna de membrana es llamada “fagóforo” o “membrana aislada”. Después los autofagosomas reciben constituyentes lisosomales, como las proteínas de membrana lisosomales y las bombas de protones mediante un proceso de fusión con endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVBs). Posteriormente los autofagosomas se fusionan con los lisosomas (Dunn, 1990) (Figura 9). Después de la fusión con los endosomas o lisosomas, los autofagosomas se denominan amfisosomas o autolisosomas, respectivamente. El citoplasma y la membrana que le envuelve son degradados por hidrolasas lisosomales, y los productos de degradación son transportados de vuelta al citoplasma donde pueden ser reutilizados para procesos de biosíntesis o producción de energía. Una vez que el material ha sido degradado en los autolisosomas, estos pasarán a ser lisosomas que estarán preparados para llevar a cabo otra fusión con endosomas o autofagosomas. Otra posibilidad, en el caso de que la degradación de los productos no sea completa, es que el autolisosoma se convierta en un cuerpo residual que contiene material no digerible y lipofucsina.

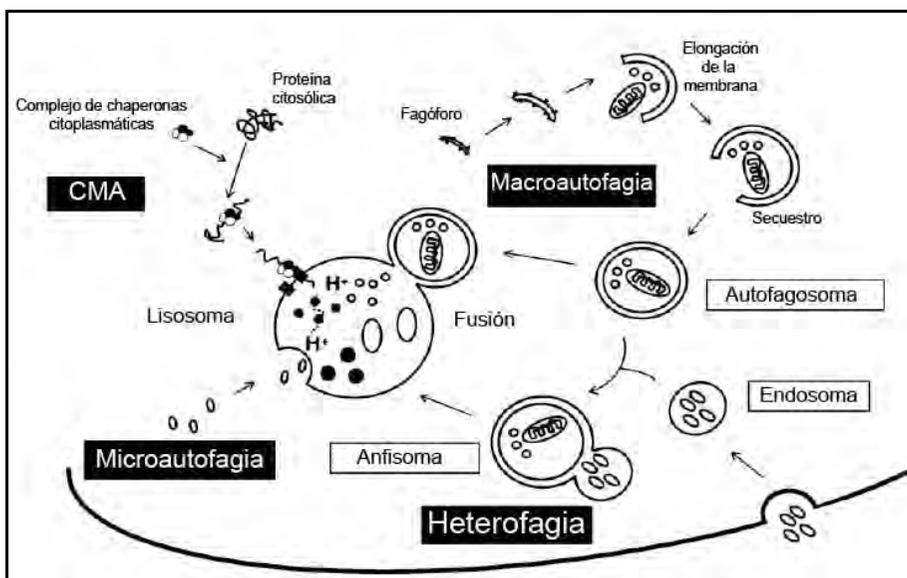


Figura 9. Rutas de autofagia. Los sustratos pueden provenir de fuera de la célula (Heterofagia) o son intracelulares (Autofagia). En la macroautofagia, el material citoplasmático que va a degradarse se recubre de membrana formando un autofagosoma que se fusionará con el lisosoma. En la microautofagia, la membrana lisosomal secuestra parte del citoplasma. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas son transportadas por las chaperonas hasta el lisosoma. Adaptada de Platini *et al.*, 2010.

1.4.5.1. Proteínas Atg

Se conocen unos 30 genes relacionados con autofagia en levaduras con el nombre común de ATG (Suzuki y Ohsumi, 2007) y se han identificado muchos de sus homólogos en mamíferos, ya que los mecanismos de autofagia están altamente conservados.

Atg1 es una serina-treonina quinasa cuya función en la cascada de señalización es la activación de la autofagia (Kamada *et al.*, 2000). Atg1 interacciona con Atg13, que disminuye su fosforilación, lo cual aumenta el número de complejos Atg1-Atg13 (Kamada *et al.*, 2000). El homólogo de Atg1 en mamíferos es ULK1 (Chan *et al.*, 2007).

Atg6 tiene su función bien en la cascada de señalización o durante la formación de fagosomas. El homólogo de mamíferos de Atg6 es denominado Beclin 1. Esta proteína tiene una función central en la regulación de la autofagia. Beclin 1 forma

un complejo con la proteína Vps34 que pertenece a la familia de las PI3K de clase III (Kihara *et al.*, 2001). Vps34 se asocia con la serina treonina quinasa Vps15 mientras que la proteína codificada por el gen asociado a la resistencia a la irradiación por ultravioletas (UVRAG), se asocia al complejo Beclin 1-Vps34 y acelera la autofagia (Liang *et al.*, 2006) (Figura 10). Beclin1 también se une a las proteínas protooncogénicas Bcl-2 y Bcl-XL, esta unión disminuye la actividad de quinasa de Vps34 e inhiben la formación del autofagosoma (Maiuri *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2005).

Existen otros dos complejos necesarios para la formación del autofagosoma: los sistemas Atg12-Atg5 y Atg8-fosfatidiletanolamina (Ohsumi, 2001). El complejo Atg12-Atg5 ayuda a la formación de los autofagosomas y Atg8, cuyo homólogo en mamíferos es LC3, también ayuda a la formación de los autofagosomas, posiblemente favoreciendo la fusión de la membrana (Figura 10) (Nakatogawa *et al.*, 2007).

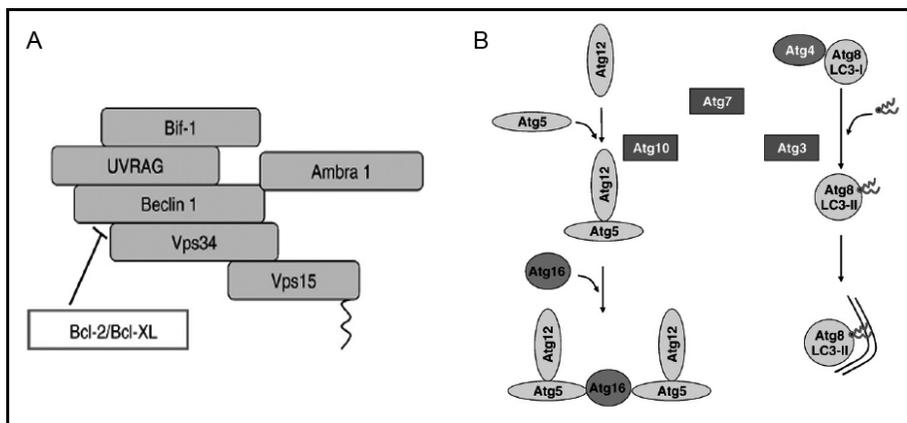


Figura 10. Panel A: Complejo Beclin1-Vps34. La subunidad Vps15 contiene un residuo lipídico que contribuye al anclaje a la membrana. **Panel B: Sistema Atg12-5-8.** El sistema Atg-12-5-8 facilita la formación de los autofagosomas y favorece la fusión con de la membrana.

1.4.5.2.Regulación de la autofagia

Un mecanismo fisiológico importante en la regulación de la macroautofagia es la disponibilidad de nutrientes, en particular los aminoácidos (Meijer y Codogno, 2006). Se han propuesto dos sensores de aminoácidos en la señalización de la

autofagia: la proteína quinasa Gcn2, que es activada por moléculas de RNA de transferencia no cargadas (Talloczy *et al.*, 2002) y un receptor de aminoácidos putativo localizado en la membrana plasmática (Kanazawa *et al.*, 2004) que localizarían los niveles de aminoácidos intracelulares y extracelulares respectivamente. Las señales de Gcn2 en la autofagia, están mediadas la fosforilación del factor de iniciación eIF2 alfa (Talloczy *et al.*, 2002), mientras que el receptor de la membrana plasmática iniciaría la vía de la autofagia posiblemente mediante la proteína quinasa mTOR (Kanazawa *et al.*, 2004). mTOR, tiene una función conservada como sensor de alimentos, regulación del crecimiento y de la proliferación así como control de una gran variedad de procesos metabólicos y juega por tanto un papel crucial en la regulación de la autofagia (Pattingre *et al.*, 2008). La inhibición de mTOR mediante rapamicina activa la autofagia (Blommaert *et al.*, 1995), además como mTOR puede actuar como sensor de ATP sus niveles pueden controlar la autofagia directamente y/o mediante la vía de señalización de mTOR (Meijer y Codogno, 2007). El calcio citosólico libre también ejerce un control sobre la autofagia ya que moviliza agentes como la Vitamina D3 y el ATP, las cuales inhiben mTOR y desencadenan autofagia (Hoyer-Hansen *et al.*, 2007).

La unión de Bcl-2 y Beclin 1 está regulada por la cantidad de aminoácidos, y durante la privación de los mismos Bcl-2 es fosforilada por la quinasa JNK evitando su unión a Beclin 1 activando así el proceso de autofagia (Wei *et al.*, 2008). También las proteínas G triméricas y algunas proteínas asociadas a éstas regulan la formación del autofagosoma de forma dependiente de la actividad de ERK 1/2 (Pattingre *et al.*, 2003).

Las PI3Ks también regulan la autofagia, cuya activación suele ser inductora, excepto las de clase I que son inhibitoras, por tanto PTEN favorece la autofagia, mientras que RAS participa en el control negativo como efector en la vía de PI3K (Arico *et al.*, 2001; Furuta *et al.*, 2004; Petiot *et al.*, 2000). El factor de transcripción FoxO3, se ha descrito como necesario y suficiente para la inducción de autofagia en el músculo esquelético (Mammucari *et al.*, 2007), FoxO3 se encuentra al final de la vía de Akt, induciendo la transcripción de muchos genes relacionados con la autofagia, su efecto en la autofagia no lo revierte la rapamicina, lo que indica que es independiente de la señalización de mTOR (Figura 11).

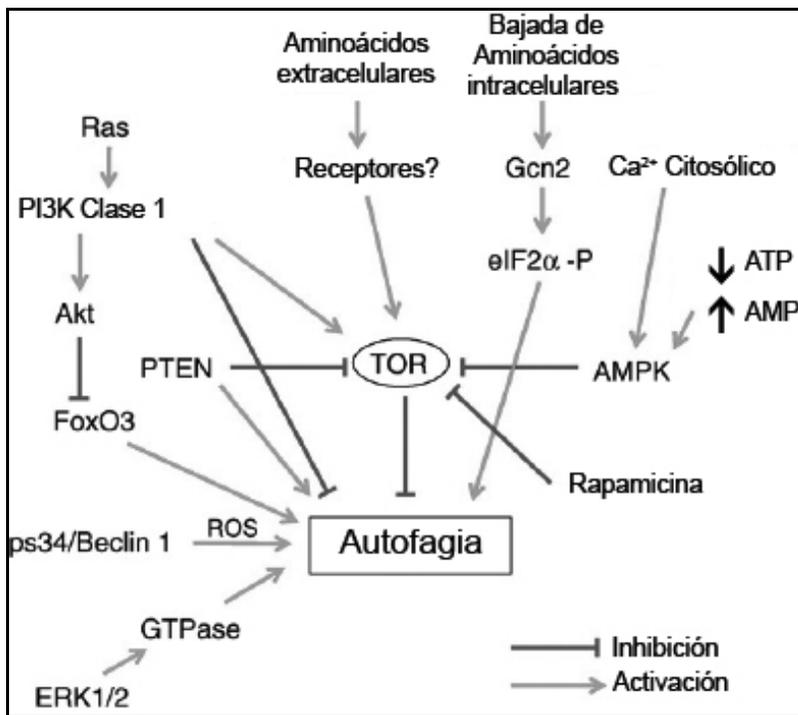


Figura 11. Modelo de las vías de señalización que regulan la autofagia. GTPase: Proteína de unión al GTP trimérica. AMPK: proteína quinasa activada por AMP. eIF2 α : factor de iniciación eucariota 2 α ; ROS: especies reactivas de oxígeno. Adaptada de Eskelinen y Saftig, 2009.

1.4.5.3. Autofagia y cáncer

Un déficit en la inducción de la autofagia contribuye al desarrollo del cáncer (Bialik y Kimchi, 2008). Se ha observado supresión monoalélica de Beclin 1 en un gran número de tumores de mama y ovario mientras que la sobreexpresión de Beclin 1 en líneas de cáncer de mama incrementa la autofagia y disminuye el crecimiento de estas células, además los otros componentes del complejo promotor de la autofagia (beclin 1/Vsp 34), UVRAG y Ambra 1, también son genes supresores de tumores (Figura 10); (Fimia *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2006). Por otro lado, mutaciones en las proteínas protooncogénicas Bcl-2 y Bcl-XL inhiben la autofagia y favorecen la progresión del cáncer (Patingre *et al.*, 2005). Ocurre lo mismo con la sobreactivación tanto de RAS como PI3K que se encuentran desreguladas en un gran número de tumores (Braun y Shannon, 2008; Stokoe, 2005).

1.5. Terapia lipídica de membrana

Las membranas definen las células y sus orgánulos, participan en los procesos celulares (bioquímicos, señalización metabólica, genéticos, detoxificación, organización, biosíntesis, procesos líticos y de reciclaje) y limitan los distintos espacios celulares donde se llevan a cabo estos procesos. La gran diversidad de los diferentes tipos celulares en el cuerpo humano se refleja en la enorme variedad de composiciones y estructuras de membranas (Yeagle, 2005). Cientos de proteínas celulares interactúan con la membrana a través de diferentes vías. Las proteínas integrales (transmembrana) atraviesan la bicapa lipídica y su actividad es sensible a los cambios en el ambiente lipídico (Lee, 2004). Las proteínas periféricas se unen a las membranas de forma reversible y su actividad es regulada por la organización de los lípidos de membrana (Vogler *et al.*, 2004). Ciertas proteínas se asocian a dominios de la membrana, como las caveolas que resultarán en vesículas de endocitosis, los *lipid rafts* o los sinaptosomas.

Se han descrito alteraciones tanto en el tipo como en los niveles de los lípidos que componen la membrana en diversas patologías, por lo que sería viable desarrollar terapias específicas basadas en la regulación de la estructura lipídica de la membrana. En este sentido se han realizado estudios que demuestran que los diferentes tipos de lípidos y su abundancia relativa en la membrana celular pueden controlar numerosas funciones y regular la actividad y la localización de proteínas de membrana (Escriba *et al.*, 1997; Escriba *et al.*, 1995; Lee, 2004; Vogler *et al.*, 2004; Yeagle, 2005).

En este contexto, la terapia lipídica de membrana, es una estrategia innovadora que se basa en la regulación de la estructura de la membrana y en consecuencia de la señalización celular (Escriba, 2006). Debido a que los lípidos de la membrana participan en la señalización celular y pueden constituir receptores para ciertos fármacos, sus efectos podrían estar asociados con la modulación de las propiedades físico-químicas de la membrana y por consiguiente, con la actividad de proteínas implicadas en importantes vías de señalización celular (Martinez *et al.*, 2005b).

Por otro lado, cabe mencionar la potencial especificidad de la terapia lipídica de membrana. Esta especificidad puede generarse por el grado de diversidad en la

composición, estructura y ordenamiento de los lípidos en las membranas biológicas (Escriba, 2006)

Los fármacos que pueden considerarse potencialmente aplicables en la terapia lipídica de membrana son aquellos que actúan uniéndose a lípidos de membrana (Martinez *et al.*, 2005b). Esto contrasta con la quimioterapia convencional que se basa en la interacción de los fármacos con las proteínas, aunque en la mayoría de casos lo que se pretende es regular la actividad de dicha proteína (Figura 12).

La variedad de tipos lipídicos y de estructuras de membrana generan un escenario apropiado en el que se pueden diseñar terapias lipídicas de membrana. Para ello se deben tener en cuenta diversas áreas:

- La relación estructura - función de los lípidos
- Las interacciones entre proteínas y lípidos
- El papel de la estructura lipídica y de la proteína en la actividad celular y procesos patofisiológicos.

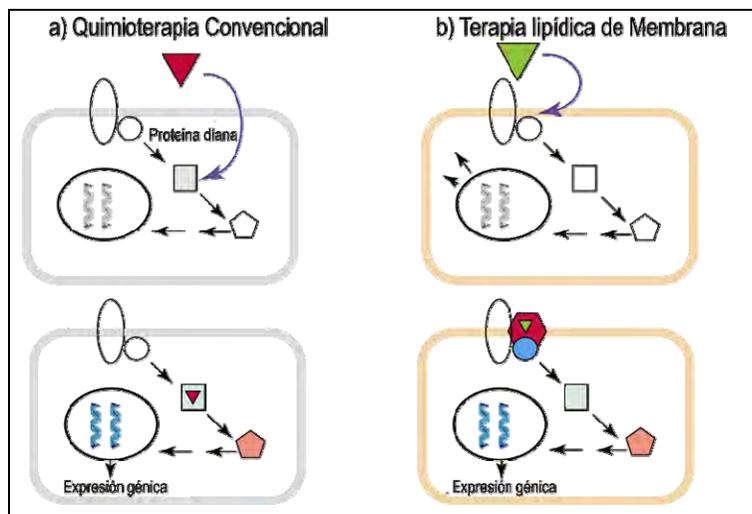


Figura 12. Terapias utilizadas en el tratamiento del cáncer. El panel superior muestra células patológicas y el mecanismo de acción de la terapia. **a) Quimioterapia convencional:** el fármaco interactúa con una proteína diana y modifica su actividad. **b) Terapia lipídica:** Los fármacos se unen a la membrana, regulando su estructura y modulando la actividad de las proteínas unidas a ellas. Modificada de Escribá 2006.

1.5.1. Estructura lipídica de la membrana

La estructura de la membrana modula su organización lipídica y controla la función proteica. Los estudios de las estructuras proteicas empezaron en 1930 (Perutz, 1992), sin embargo el estudio de la estructura lipídica de la membrana empezó hace apenas 30 años (Singer y Nicolson, 1972), lo cual ha retrasado el desarrollo de terapias que tienen lípidos como diana. Existe una gran variedad de clases de lípidos (fosfolípidos, esfingolípidos, lisofosfolípidos, isoprenoides, glicolípidos, ácidos grasos libres, ceramidas, triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol), los cuales pueden ser divididos en subclases, y cada una de ellas comprende un gran número de tipos de lípidos.

Los lípidos de la membrana tienen propiedades físicas diferentes (a veces incluso entre la misma clase de lípidos), en términos de fluidez, área de la sección transversal, carga eléctrica, peso molecular y propensión a formar fases no lamelares. Los lípidos no están unidos covalentemente a la membrana sino que interactúan dinámicamente para formar uniones transitorias cuya estabilidad puede variar (Vereb *et al.*, 2003), lo que contribuye a la complejidad del estudio estructural. Además los lípidos de membrana presentan polimorfismo, es decir, pueden existir una gran variedad de diferentes estructuras supramoleculares organizadas. El número de estructuras secundarias posibles formadas por lípidos es mucho mayor que el de las formadas por proteínas y ácidos nucleicos (Figura 13).

La fase lamelar (bicapa lipídica) es el agrupamiento más usual entre los lípidos en las células y se han descrito bastantes tipos de estructuras lamelares. La fase lamelar fluida (también llamada L_{α} o líquida cristalina) es la estructura más abundante en las membranas celulares. En estas estructuras la cadena hidrocarbonada del lípido tiene un alto nivel de movilidad. Bajo diferentes condiciones, los lípidos se pueden organizar en más tipos de estructuras lamelares, como las fases L_{β} (gel), más empaquetadas o L_c (pseudo cristalina) (Yeagle, 2005). Los *lipid rafts* forman dominios definidos l_o (líquido-ordenado) (Aussenac *et al.*, 2003). En las fases l_o , las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se extienden y se empaquetan fuertemente como en la fase gel, pero tienen un grado muy alto de movilidad lateral. En las regiones con estructura l_o se

asocian proteínas como la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G donde interactúan y regulan proteínas efectoras como la adenilil ciclasa (Oh y Schnitzer, 2001; Vogler *et al.*, 2004)

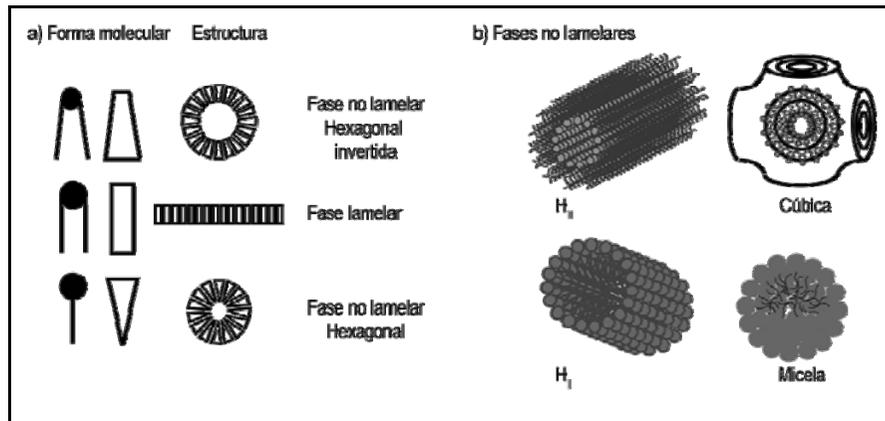


Figura 13. Polimorfismo lipídico. La adición de lípidos con forma de cilindro, como la fosfatidilcolina, da lugar a una monocapa que en un ambiente acuoso tiende a organizarse en una estructura bicapa para estabilizar las regiones hidrofóbicas de los fosfolípidos. Los lípidos como el diacilglicerol y la fosfatidiletanolamina, con cabezas polares pequeñas, tienen una forma de cono truncado. Cuando estos lípidos se agregan forman fases no lamelares invertida (fase hexagonal H_{II} y cúbica). Los lípidos con una cabeza polar grande tienden a formar fases no lamelares como H_I y Micelas.

En células sanas las estructuras no lamelares son infrecuentes, aunque la presencia de estas estructuras o la propensión de las membranas a adoptarlas están asociadas a importantes funciones celulares como por ejemplo en procesos de fusión y fisión de membranas (Cullis *et al.*, 1986). La presencia de algunos lípidos con propensión a formar estructuras no lamelares en las membranas biológicas regulan las propiedades de la bicapa. Por ejemplo la fosfatidiletanolamina, incrementa la propensión a formar fases no lamelares (curvatura negativa), que es necesaria para algunos procesos de señalización celular (Vogler *et al.*, 2004).

Un aspecto importante de las membranas biológicas es la existencia de asimetrías. En la bicapa lipídica, la monocapa interna y externa tienen una

composición lipídica diferente. Por un lado, la monocapa citosólica contiene altos niveles de fosfatidilserina y forfatidiletanolamina, mientras que la monocapa extracelular es rica en fosfatidilcolina y esfingomielina (Verkleij *et al.*, 1973). También se encuentra asimetría lateral en tipos celulares polarizados como las células epiteliales, endoteliales, y algunas células glandulares como las células acinares que tienen una membrana basal, lateral y apical con una composición lipídica y proteica definida. Cuando estas regiones son pequeñas nos referimos a ellas como dominios de membrana. Algunos dominios de membrana como las caveolas, invaginaciones, agrupaciones de receptores o de canales, sinaptosomas y *lipid rafts*, han sido bien descritos (Bagatolli *et al.*, 2010).

Algunos de estos dominios son estables como los sinaptosomas, mientras que otros son transitorios o móviles, como los *lipid rafts* (Baumgart *et al.*, 2003; Vereb *et al.*, 2003). Por tanto los lípidos y las estructuras que estos forman, son diversas y proveen de un aspecto especial a las membranas que son necesarias para mantener numerosas funciones celulares.

1.5.2. Estructura lipídica y función celular

Los lípidos de membrana están implicados en funciones celulares cruciales que justifican la presencia de los diferentes tipos de lípidos presentes en la membrana. Su regulación y la adaptación a los cambios del medio denotan su relevancia en la fisiología celular. Una característica biofísica de la membrana, es la fluidez, que está íntimamente relacionada con la actividad de importantes proteínas (Vessey y Zakim, 1974). Los lípidos de membrana no son las únicas moléculas que influyen en la estructura de la membrana, las proteínas que interactúan con la membrana pueden también modular la estructura lipídica secundaria, regulando las propiedades locales de las bicapas lipídicas, por ejemplo las regiones transmembrana de los receptores de membrana y las porciones isoprenil de las subunidades G γ de las proteínas G incrementan la propensión de las membranas a la fase no lamelar (Chen y Manning, 2001; Funari *et al.*, 2005). Además estas y otras modificaciones co/post-traduccionales (miristoilación y palmitoilación) parecen ser relevantes en las interacciones con las membranas (Chen y Manning, 2001). La propensión a formar fases no lamelares puede regular la actividad de la señalización de varias proteínas como los adrenoreceptores α_{2AD} , proteínas G,

adenilil ciclasa y la proteína quinasa C (PKC), así como en la fusión y la fisión celular (Alemany *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005).

1.5.3. Modulación de la estructura de la membrana lipídica

La participación de los lípidos de membrana en las actividades celulares indica que puede haber dianas para fármacos cuyos efectos farmacológicos estén asociados con la modulación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas. Numerosos estudios han mostrado que la relación estructura-función que controla la actividad de las proteínas también es aplicable a los lípidos de membrana (Vereb *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). Un ejemplo de la relación estructura-función en los lípidos la encontramos en los ácidos grasos de dieciocho carbonos. Mientras que la insaturación cis del ácido oleico incrementa la propensión a la fase no lamelar H_{II}, su análogo con insaturación trans, el ácido elaídico, no altera significativamente la estructura de la membrana. El comportamiento del ácido elaídico es próximo al del ácido esteárico (ácido graso saturado). Otro ejemplo es el ácido oleico que altera la actividad de las proteínas de señalización de la membrana, pero no el ácido elaídico ni el ácido esteárico, (Yang *et al.*, 2005). Por tanto las diferencias en estructura molecular son más importante que las diferencias químicas en la regulación de la estructura de la membrana (Funari *et al.*, 2003; Prades *et al.*, 2003).

1.5.4. Terapia lipídica de membrana en el tratamiento de patologías humanas

Existen numerosos estudios sobre los efectos de algunos lípidos de la dieta o de ciertos fármacos (anestésicos y alcoholes) en la estructura de la membrana y en su función (Frangopol *et al.*, 2001; Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1996), pero los lípidos no han sido nunca considerados como dianas para el desarrollo de fármacos. Se ha observado que el tipo y/o la composición de de los lípidos de membrana pueden estar alterados en diversas patologías.

Algunas enzimas, GPCRs y proteínas relacionadas, interactúan con las membranas y pueden ser moduladas por terapias lipídicas específicas. La terapia lipídica de membrana podría tener un gran potencial en el tratamiento de muchas patologías, entre ellas las cardiovasculares, como la hipertensión, aterosclerosis,

enfermedades coronarias, integridad de los vasos sanguíneos y trombosis (Escriba *et al.*, 2003; Luostarinen *et al.*, 1993; Perona y Ruiz-Gutierrez, 2005). En este contexto, el ácido oleico incrementa la propensión a formar fases H_{II} en la membrana regulando la actividad de los GPCRs, proteínas G y efectores que controlan la presión sanguínea que se encuentran alterados en sujetos hipertensos. Sin embargo, el ácido esteárico y el ácido elaídico, no inducen efectos similares (Funari *et al.*, 2003; Prades *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). Por tanto un alto consumo de trioleína, que contiene un elevado porcentaje de ácido oleico, está asociado a una disminución del desarrollo de patologías cardiovasculares (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1996; Teres *et al.*, 2008). En este contexto, el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA, Minerval), un análogo estructural del ácido oleico, pero al que se le ha añadido un grupo hidroxilo en el carbono α de su cadena hidrocarbonada) (Figura 14) presenta un importante efecto hipotensor (Alemany *et al.*, 2004).

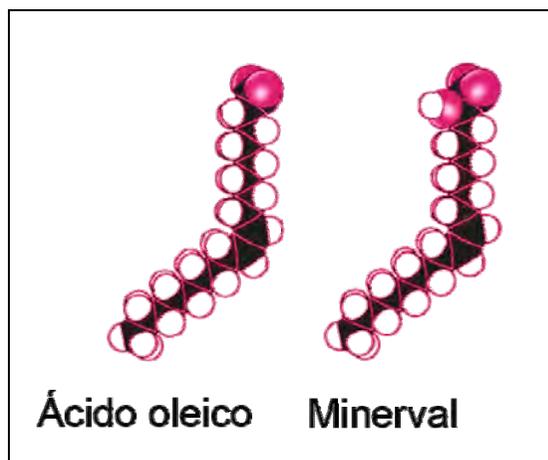


Figura 14. Estructura del ácido oleico y del ácido 2-hidroxioléico (Minerval).

También se han observado alteraciones en la composición de la membrana lipídica de diferentes tipos celulares en sujetos obesos (Younsi *et al.*, 2002). Estas modificaciones lipídicas inducen cambios en la actividad de las proteínas de la membrana (Faloia *et al.*, 1999).

Después del tejido adiposo, el tejido neuronal es el segundo tejido con más cantidad de lípidos. La lipoproteína Apo E (abundante en el cerebro) influye en la composición lipídica de los *lipid rafts* de la membrana. Las anomalías en la proteína Apo E de pacientes con Alzheimer provoca cambios en la señalización celular debido a alteraciones en composición lipídica de la membrana (Lane y Farlow, 2005). Estos cambios dan lugar a alteraciones de las propiedades fisicoquímicas y de la señalización de la actividad de las proteínas que son relevantes en la etiología de la enfermedad (Chauhan, 2003; Micelli *et al.*, 2004). También se ha observado que los cambios en la composición lipídica de la membrana regulan las interacciones lípido-proteína y la toxicidad de los péptidos β -amiloides (Arispe y Doh, 2002). Por tanto, las dietas suplementadas con fosfolípidos y ácidos grasos tienen efectos beneficiosos en el estado mental de los pacientes con Alzheimer y en modelos animales de envejecimiento (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003; Crook *et al.*, 1992).

Los lípidos de membrana también están involucrados en enfermedades infecciosas. Los *lipid rafts* son usados como plataformas por microorganismos que infectan células humanas (Grassme *et al.*, 2005). El NK-2 es un péptido hidrofóbico utilizado como antibiótico que se une a la membrana regulando la estructura de la misma y eliminando las bacterias pero no las células humanas debido a la diferente composición y /o estructura de las células eucariotas y procariontes (Willumeit *et al.*, 2005). En este sentido se podrían aplicar diferentes terapias lipídicas para combatir enfermedades infecciosas o para vencer la resistencia a los antibióticos convencionales.

Ensayos clínicos y con animales de experimentación, indican que los ácidos grasos Omega-3 podrían tener propiedades antiinflamatorias y podrían ser útiles en la inflamación, el asma u otras enfermedades autoinmunes (Simopoulos, 2002).

1.5.4.1. Terapia Lipídica y Cáncer: Minerval y su efecto antitumoral

Como se describe en el apartado 1.1, las células tumorales se caracterizan por tener diversas alteraciones en las señales celulares, que dependerán del tipo de cáncer y del paciente. Existen una gran variedad de moléculas implicadas en el control de la proliferación celular y en la supervivencia y muchas de ellas son proteínas asociadas a la membrana (Apartado 1.5.2). Se han observado

alteraciones en los niveles de los lípidos de membrana de los pacientes con cáncer (Hendrich y Michalak, 2003; Mikirova *et al.*, 2004) y en células resistentes a la quimioterapia (Escriba *et al.*, 1990). Existen fármacos y moléculas anticancerígenas cuya actividad está asociada a una alteración de la estructura de los lípidos de membrana, como por ejemplo la daunorubicina y el hexamethylen bisacetamida (HMBA), que alteran la propensión a formar fases no lamelares en las membranas (Escriba *et al.*, 2002; Escriba *et al.*, 1995). La Edelfosina y la Miltefosina también tienen como diana las membranas celulares (Jendrossek y Handrick, 2003). Se ha observado que en algunos casos, las células resistentes a fármacos presentan alteraciones en la composición lipídica o en las propiedades de la membrana (Hendrich y Michalak, 2003). En los estudios realizados por Ramu y colaboradores con células de leucemia murina se observó que las células que presentaban resistencia a la doxorubicina presentaban menos fluidez en su membrana debido a un cambio en la ratio fosfatidilcolina/esfingomiélin de su membrana plasmática (Ramu *et al.*, 1984).

El desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos que tienen como diana la membrana celular se basa en el conocimiento de que las antraciclinas muestran actividad citotóxica sin necesidad de entrar en la célula, debido a su interacción con la membrana plasmática (Escriba *et al.*, 1990; Triton y Yee, 1982). Estos fármacos son capaces de modificar las señales asociadas a PKC y los GPCRs mediante la regulación de la estructura de la membrana (Escriba *et al.*, 1995). En este contexto el Minerval se presenta como un potencial nuevo fármaco antineoplásico.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se observaron diferentes mecanismos de acción del Minerval según la línea celular tratada. En algunas de líneas celulares tumorales estudiadas, el Minerval desencadena la maquinaria apoptótica, mientras que en otras se ha observado la inhibición de la proliferación celular. El Minerval no indujo efectos antiproliferativos, proapoptóticos ni ningún otro tipo de efecto citotóxico en la línea IMR90 de fibroblastos no tumorales (Llado *et al.*, 2010). El Minerval tiene una IC_{50} para las células tumorales de entre 50-200 μM mientras que la IC_{50} para fibroblastos sanos (IMR90) es de más de 5000 μM (Llado *et al.*, 2010). También se ha observado la falta de efectos histopatológicos

en tejidos normales de ratas tratadas a altas dosis de Minerval (Martinez *et al.*, 2005b)

La actuación del Minerval podría estar ligada a la regulación de la composición y la estructura de la membrana plasmática, en la cual se uniría a los lípidos y regularía su estructura, induciendo modificaciones en su composición como el aumento de los niveles de esfingomielina (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011). Algunos de estos efectos implican la interacción entre el Minerval y proteínas como ocurre con la esfingomielina sintasa (SMS). El resultado de dicha interacción es un aumento marcado de la esfingomielina en la membrana (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011). Estos cambios en la composición lipídica de la membrana, dan lugar a modificaciones en la localización y actividad de proteínas de señalización periféricas (Martinez *et al.*, 2005b). En células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, tratadas con Minerval, se observa un descenso en los niveles de ciertas ciclinas y CDKs y la hipofosforilación de la pRb, la cual permanece unida a E2F-1 inhibiendo la activación transcripcional de muchos genes en el crecimiento celular (Martinez *et al.*, 2005a). En este sentido se ha observado que la inhibición de la proliferación celular provocada por el Minerval, está relacionada con la inhibición de la proteína DHFR, una enzima crucial para la síntesis del ADN y por tanto de la proliferación celular (Llado *et al.*, 2009).

La traslocación de PKC a la membrana, la inhibición de la expresión de E2F-1 (Martinez *et al.*, 2005a; Martinez *et al.*, 2005b), la silenciación de DHFR (Llado *et al.*, 2009) son algunos de los mecanismos de acción propuestos para el funcionamiento del Minerval, que desencadenarían respuestas como la apoptosis o la parada del ciclo celular.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo celular

Las distintas líneas celulares utilizadas en los estudios (Tabla 2), se adquirieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) a través de *Sigma-Aldrich Co* (St Louis, MO), con excepción de la línea celular SF-767 obtenida en el *Brain Tumor Research Center Tissue Bank* (San Francisco, CA).

Las distintas líneas celulares, se cultivaron en el medio indicado en la Tabla 2, suplementadas con un 10% de suero fetal bovino (*Sigma-Aldrich Co*, St Louis, MO), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (*PAA Laboratories GmbH, Austria*) y un 1% de aminoácidos no esenciales (*Sigma-Aldrich Co*, St Louis, MO) en el caso de ser requeridos.

El cultivo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo vertical (*Telstar S.A., Terrassa, España*) y se mantuvieron en un incubador de células a 37°C, 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%.

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas

Línea celular	Origen de la línea	Mutaciones	Medio de cultivo
A549	Adenocarcinoma pulmonar	CDKN2A, CDKN2a (p14), KRAS, SMARCA4, STK11	RPMI 1640
SF-767	Glioma de grado III		RPMI
MRC5	Fibroblastos embrionarios humanos de pulmón		DMEM [§]

§ El medio DMEM se suplementó con un 1% de aminoácidos no esenciales.

2.1.1. Tratamientos Celulares

Las células se cultivaron en monocapa con una densidad de $1 \cdot 10^4$ células/cm² 24 horas antes de aplicar los tratamientos con Minerval. La duración de los tratamientos osciló entre 3 y 96 horas dependiendo de cada experimento. Las concentraciones de Minerval que se utilizaron variaron entre 150 y 200 µM para los experimentos de señalización y de entre 50 y 1000 µM para los experimentos de viabilidad celular.

2.1.1.1. Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular, se llevaron a cabo mediante el ensayo del MTT (bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio), que se basa en la reducción mitocondrial del reactivo MTT, que da lugar a un precipitado cuya densidad óptica es directamente proporcional al número de células sembradas. Se sembraron $1 \cdot 10^4$ células/cm² en placas de 96 pocillos y se trataron con concentraciones crecientes de Minerval (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 750 y 1000 μ M) durante distintos tiempos (3, 6, 12, y 24 horas). Una vez transcurrido este tiempo se descartó el medio y se añadió medio fresco con un 0,5% de reactivo MTT con el que se incubaron las células de 45 a 120 minutos. Una vez formados los cristales violetas en el interior de las células, se descartó el medio y se disolvieron los cristales con DMSO dejando la placa en agitación suave durante 10 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm corregida a 650 nm en un lector de placas (*FluoStar Omega, BMG Labtech, Alemania*).

2.1.1.2. Análisis de la señalización celular

En los experimentos de análisis de la señalización celular, las células se mantuvieron privadas en un medio sin suero que contenía un 0,1% de BSA (Albúmina sérica bovina) durante 12 horas. Los tratamientos con Minerval se administraron con este mismo medio al que se añadió EGF a una concentración de 30 nM (*R&D Systems, Reino Unido*) durante 15 minutos. A continuación, fueron lavadas con PBS a 4°C y recogidas para su procesamiento.

2.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos inmunodeprimidos NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} (Laboratorios Charles River, Francia) de 4-6 semanas de edad y con un peso comprendido entre 25-30 gramos.

Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico (no más de 7 animales por jaula), en un armario (EHRET, Labor_U_Pharmatechnik) con temperatura constante de 28°C, una humedad relativa de entre el 40 y el 60% y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Jaulas, agua, serrín y comida se esterilizaron mediante

autoclavado. En todo momento recibieron una dieta estándar con pienso y agua *ad libitum*. Las condiciones de manipulación y trabajo se realizaron siempre en un ambiente estéril.

2.2.1. Tratamiento de los animales

En función de las condiciones experimentales se establecieron dos grupos de animales:

- a) Animales tratados con el vehículo (Control).
- b) Animales tratados con los compuestos indicados en la Tabla 3.

Tabla 3. Administración y posología de los fármacos utilizados

Fármaco	Dosis	Posología / Vía de administración	Vehículo	Tipo celular
Cisplatino	100mg/Kg	72 h (i.p.)	Suero Fisiológico	A549
Erlotinib	30 mg/Kg	24 h (p.o.)	Agua	A549
Minerval	600mg/Kg	24 h (p.o.)	Trioleína	A549, SF-767
Temozolomida	80mg/Kg	24 h (p.o.)	Agua	SF-767

(p.o.): vía oral. (i.p.): vía intraperitoneal.

Los distintos grupos de animales se trataron por vía oral (p.o.) o vía intraperitoneal (i.p.) con los distintos principios activos descritos en la Tabla 3, de forma crónica cada 24 horas durante 50 días.

Tras los tratamientos, los animales se sacrificaron por decapitación. Los tumores, fueron rápidamente diseccionados sobre hielo, introducidos en viales estériles, congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta el momento de su utilización. Las muestras destinadas al estudio histológico se conservaron en paraformaldehído al 4%.

Todos los protocolos fueron revisados y aprobados de acuerdo con el Comité Institucional de Investigación Animal (Comisión de Bioética de la Universitat de les Illes Balears).

2.2.2. Inoculación subcutánea de células tumorales y medición del tumor

Las células de la línea tumoral objeto de estudio se cultivaron en placas de 150 mm de diámetro (condiciones descritas en la Tabla 2) hasta una confluencia del 80-90%. Para recoger las células se eliminó el medio por aspiración y se hizo un lavado con PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 12 mM de Na₂HPO₄, 1,38 mM de KH₂PO₄, pH 7,4) y se incubaron 5 minutos a 37°C con 0,5% de tripsina (*Sigma-Aldrich Co*, St Louis, MO) y 0,8% de EDTA disueltos en PBS. Se recogieron las células por aspiración, se añadieron al medio de cultivo correspondiente y se centrifugaron 5 minutos a 600 xg. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en un volumen conocido de medio para determinar la densidad de células viables en la suspensión mediante tinción con azul tripán (*Sigma-Aldrich Co* St Louis, MO) y conteo en una cámara de Bürker. Se calculó el número de células viables por volumen conocido y se resuspendieron en medio sin completar.

Para el desarrollo de modelos de xenotrasplantes de tumores humanos, se inyectaron 7,5 millones de células objeto de estudio de forma subcutánea (s.c.) con una aguja de calibre 25G a cada ratón, en un volumen de 150 µl de medio sin completar.

El tumor se indujo aproximadamente entre 5 y 7 días después de la inoculación dependiendo del tipo celular. Se comenzaron los tratamientos cuando el tumor presentaba un volumen entre 5 y 7 mm³. El desarrollo del tumor se midió de dos a tres veces por semana con un pie de rey digital.

Los volúmenes del tumor se calcularon mediante la siguiente fórmula (Barbacci *et al.*, 2003):

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = (\text{A}^2 \times \text{L})/2$$

Donde **A** es la anchura y **L** es el largo del tumor

2.2.3. Inoculación intracraneal de células de glioma humano SF-767

Para el desarrollo de un modelo ortópico de glioma humano, se inocularon 200.000 células SF-767 en un volumen total de 3 μl en cerebros de ratones inmunodeprimidos mediante estereotaxia, un sistema tridimensional de ejes y coordenadas espaciales que permiten buscar puntos específicos en el cerebro del ratón (Athos y Storm, 2001).

El aparato de estereotaxia consiste en un soporte en el que se coloca al animal y en el que se le inmoviliza mediante unas barras de acero que se introducen en el pabellón auricular y una abrazadera donde se fijan los incisivos (*Panlab S.L.U, Cornellà, España*). El resto del aparato está compuesto por dos brazos metálicos en los que se encuentran los ejes graduados, y en los cuales se acoplan por un lado el trepanador para realizar el orificio en el cráneo del ratón y en el otro brazo se acopla una cánula que va unida a una jeringuilla de 10 μl (Hamilton Bonaduz AG, Switzerland) con la que se inocularon las células. El aparato de estereotaxia y el material de cirugía fue desinfectado previamente con un desinfectante de alto nivel (*Instrunet esporicida, Lab. Inibsa, Barcelona España*).

Los animales se anestesiaron con una mezcla de Clorhidrato de Ketamina (*Imalgene 1000, Meril Laboratorios S.A., Barcelona, España*) y Xilacina (*Xilagesic, Laboratorios Calier S.A., Barcelona, España*) con una dosis de 100 y 10 mg/Kg respectivamente por vía intraperitoneal *i.p.* Posteriormente, se realizó una incisión sobre la piel del cráneo de los ratones anestesiados e inmovilizados. Con un atlas (Paxinos, 2001) se seleccionaron las coordenadas deseadas, situadas en el hemisferio derecho. Las coordenadas vienen dadas como distancias tridimensionales en mm (x,y,z) a dos puntos de referencia, fácilmente identificables

en el cerebro del ratón, como son *bregma* y *lambda*. Tomamos como referencia el punto *bregma*, formado por la intersección de la sutura sagital y la coronal. Las coordenadas que seleccionamos fueron las siguientes (Figura 15):

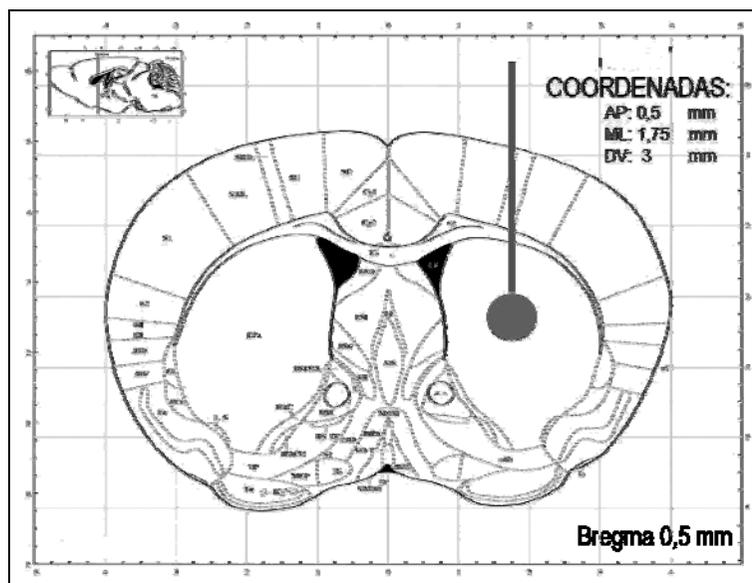


Figura 15. Coordenadas seleccionadas para la implantación de células tumorales SF-767 en cerebros de ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu}. +0,5 mm R/C (Rostro-Caudal), -1,75 mm M/L (Medio-Lateral), -3mm D/V (Dorso-Ventral)

Una vez identificado el punto *Bregma*, se anotaron las coordenadas y se movió el trepanador la distancia necesaria para llegar a nuestro punto de inyección, es decir, 0,5 mm en sentido rostral y -1,75 mm en sentido lateral, para inocular las células en el hemisferio derecho. En este punto, se realizó un orificio en el cráneo con cuidado de no perforar el cerebro, donde se introdujo una cánula acoplada a la jeringa 3 mm de forma ventral y se procedió a la inoculación de las células manteniendo una velocidad constante. Posteriormente se taponó la herida con un pequeño apósito de celulosa oxidada regenerable (*Ethicon, Inc. Norderstedt, Alemania*) y se suturó con hilo de seda trenzada 5/0 (*Laboratorios Aragón, Barcelona, España*). Durante los dos días anteriores y posteriores a la intervención se administró en el agua de bebida 40 mg/Kg de Ibuprofeno (*Dalsy, Abbot*

Científica S.A., Madrid, España) para inducir analgesia antes de la intervención y evitar el dolor post-quirúrgico en los animales.

Dos días después de la intervención, se trataron los distintos grupos de ratones vía oral cada 24 horas durante 43 días. Se establecieron tres grupos de tratamiento, el grupo Control al que se le administró el vehículo, el grupo tratado con Minerval y otro con Temozolomida a las dosis y posologías indicadas en la Tabla 3. Al finalizar el tratamiento los animales fueron sacrificados y se obtuvieron sus cerebros como muestras objeto de estudio.

2.2.3.1. Obtención de las muestras de cerebro inoculado con células SF-767

Para su caracterización inmunohistoquímica y posterior observación al microscopio óptico, los cerebros se fijaron con paraformaldehído al 4%. Los animales fueron sacrificados mediante el método de la perfusión intravascular, ya que con este método se estabilizan las proteínas del cerebro y se preservan los tejidos.

Se realizó una incisión en el ratón anestesiado y manteniendo sus constantes vitales, en la línea media del abdomen hasta el corazón. Se realizó una punción en el ventrículo izquierdo del corazón con una aguja con palomilla (valu-SeT™ 23G, 0,75 IN, 0,6x20 mm) acoplada a una jeringa de 20 ml. Con unas tijeras se realizó un pequeño corte en la aurícula derecha para evitar el exceso de presión, permitiendo la salida de la circulación de retorno. En primer lugar se administró una solución de suero salino (0,9% NaCl) con un 0,7% de Heparina sódica (Mayne Pharma S.L., Madrid, España) durante 5 minutos a una velocidad de 3 ml/minuto. Posteriormente se administró la solución fijadora (Paraformaldehído al 4% en tampón PB 0,1 M -NaH₂PO₄ 20 mM, Na₂HPO₄ 80 mM- pH 7,4) durante 20 minutos hasta obtener rigidez en las extremidades superiores y el cuello del ratón.

Una vez se fijaron los tejidos se diseccionó el cerebro del animal y se guardó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Después las muestras se conservaron en la solución PB 0,1 M a 4°C hasta su inclusión en parafina.

2.2.4. Marcaje y detección de proteínas en modelos animales de cáncer humano

Se marcaron *in vivo* la enzima Glutamina Sintetasa y el receptor EGFR en ratones inmunodeprimidos inoculados subcutáneamente con células SF-767 o A549, respectivamente.

Para el marcaje de la proteína Glutamina Sintetasa, se conjugó un anticuerpo monoclonal anti Glutamina Sintetasa obtenido en conejo (*Abcam, Cambridge, UK*) a una concentración de 1 mg/ml con el Kit de marcaje de proteínas IRDYE 800CW Protein Labeling Kit-High MW (Li-Cor, Lincoln, Nebraska USA) según las instrucciones del fabricante.

Para el marcaje del EGFR, se utilizó la sonda comercial *IRDye 800CW EGF Optical Probe* (Li-Cor, Lincoln, Nebraska USA).

En ambos casos se inyectaron 50 µl de la sonda fluorescente en la vena caudal del ratón. Cuatro días (96 horas) después, los ratones se anestesiaron vía *i.p.* con una mezcla de Ketamina/Xilacina 100/10 mg/kg, respectivamente y se escanearon a unas longitudes de onda de 680 y 800 nm con un escáner de infrarojos Odyssey (Li-Cor, Lincoln, Nebraska USA) para detectar el marcaje fluorescente de la Glutamina Sintetasa y el EGFR.

2.3. Estudios regulatorios de toxicidad *in vivo* e *in vitro*

Se llevaron a cabo los estudios preclínicos de seguridad farmacológica *in vivo*: Test de Irwin, test de función respiratoria, test de seguridad cardiovascular, toxicidad oral aguda, dosis máxima tolerada, NOAEL toxicocinética y seguridad farmacológica y determinación tóxica. También se llevaron a cabo estudios preclínicos de seguridad farmacológica *in vitro* como: el test de mutación reversa bacteriana, test de aberración cromosómica, test de micronúcleos en médula de ratón y el test de seguridad farmacológica HERG.

Los estudios se llevaron a cabo por la empresa RCC CIDA/ Laboratorios Harlan (Barcelona, España) para Lipopharma Therapeutics según los requerimientos de las siguientes normativas: Comisión Directiva 2003/63/ del 25 de junio del 2003, enmienda de la Directiva 2001/83/Ec, código relativo a productos medicinales para

el consumo humano del Parlamento Europeo y el Concilio de la Comunidad. Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) especificadas en el Real Decreto 1369/2000 y la directiva 2004/10EC del Parlamento Europeo del 11 de febrero del 2004. Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en modelos animales de ratón CD-1, ratas wistar y perros Beagle (Laboratorios Harlan, Barcelona, España)

2.4. Citometría de Flujo

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo. Las células se trataron 48 horas con Minerval, se lavaron con 1X PBS y se recogieron en tripsina-EDTA en tubos estériles de 5 ml donde se centrifugaron a 600 xg. Se lavó el precipitado con PBS 1x y se volvió a centrifugar obteniendo el pellet celular. Posteriormente las células se fijaron con etanol al 70% a 4°C que fue añadido gota a gota mientras se agitaban las muestras suavemente. Una vez fijadas, se incubaron durante al menos una hora a 4°C. Posteriormente se lavaron con una solución de citrato sódico 38 mM pH 7,4 y se centrifugaron a una velocidad de 1250 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en un tampón compuesto de citrato de sodio 38 mM pH7.4, ioduro de propidio a una concentración de 50 µg/ml y 5 µg/ml de ARNasa A (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) donde se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Finalmente se analizaron en un citómetro de flujo Beckman Coulter Epics XL (Beckman Coulter S.A, Madrid, España). Las poblaciones celulares de las diferentes fases celulares del ciclo (Sub-G1, G0/1, S y G2/M) se determinaron según su contenido de ADN con el programa WinMDI 2.9 (Verity Software House, Topsham, ME).

2.5. Detección y cuantificación de proteínas mediante técnicas inmunológicas (*Western Blot*)

Para la detección y cuantificación de proteínas, en tumores de ratón y en cultivo celular, se realizó la técnica de detección inmunológica, *Western Blot*. Tras la separación de las proteínas presentes en las muestras por electroforesis en geles de acrilamida, se identificaron y cuantificaron las proteínas de interés con los anticuerpos especificados en la Tabla 4.

2.5.1. Extracción de proteínas de tumores de ratón

Tras su descongelación, los tumores se trocearon y se pulverizaron en un mortero de porcelana utilizando N₂ líquido. El proceso de preparación de homogenado total y obtención de las proteínas totales, se llevó a cabo a 4°C en tubos de polipropileno. Las proteínas totales fueron obtenidas mediante la homogenización del tejido del tumor con una relación P/V 1:10 en un tampón de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 1% SDS, PMSF 1 mM, Iodoacetamida 5 mM, Cantaridina 1 mM y Ortovanadato Sódico 1 mM, (*Sigma-Aldrich Co*, St Louis, MO). El tejido se homogenizó durante 4 ciclos de 5 segundos con una amplitud del 20% en un sonicador Braun Labsonic U (*Braun, Melsungen*, Alemania). Posteriormente se centrifugó a 1000g durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante el cual se preparó para la determinación y cuantificación de proteínas. Se obtuvieron concentraciones de proteínas de entre 5 y 20 µg/µL.

2.5.2. Extracción de proteínas celulares de cultivos in vitro

Se recogió el medio de cultivo y se centrifugó para recuperar las células del sobrenadante. Después se lavaron las placas con PBS a 4°C y se añadió el tampón de extracción a la placa de cultivo donde se recogieron las células con un descamador y se combinaron con el sobrenadante anterior. Posteriormente se sonicaron durante dos ciclos de 5 segundos a una amplitud del 20%.

La separación de núcleos y citoplasma se realizó con el kit *Nuclear extraction Kit* (*Active Motif*, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante.

2.5.3. Determinación del contenido proteico de las muestras

La determinación del contenido proteico de las muestras se llevó a cabo utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) según las instrucciones del fabricante (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*, Rockford, USA). Este método se basa en la reducción del Cobre (de Cu²⁺ a Cu¹⁺) por las proteínas en un medio alcalino. Cuando el ácido bicinconínico reacciona con el Cobre I da lugar a un intenso color púrpura que absorbe luz a 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

De forma alternativa se utilizó el método de cuantificación de proteína *RC DC* (*Bio-Rad*, Barcelona, Spain), un método colorimétrico utilizado para la determinación de proteínas en presencia de agentes reductores y detergentes. Este método se basa en la modificación del método Lowry que se basa en la reducción del reactivo folín fenol y la absorbancia se detecta a 750nm (Lowry *et al.*, 1951).

Los valores proteicos se obtuvieron por interpolación de sus valores de absorbancia sobre la curva patrón realizada con conocidas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*, Rockford, USA)

2.5.4. Detección inmunológica: electroforesis e inmunoblot

Para la detección inmunológica de las proteínas de interés, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, también denominada SDS-PAGE (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel, electrophoresis*) (Laemmli, 1970). Es la técnica electroforética más comúnmente utilizada para el análisis de proteínas, debido a la capacidad del detergente aniónico SDS de solubilizar, disociar y desnaturalizar la mayoría de proteínas oligoméricas, dando lugar a cadenas polipeptídicas únicas que migran hacia el ánodo durante la electroforesis y su separación depende únicamente de su masa molecular. La concentración de acrilamida en el gel determina el rango de separación de las proteínas en la electroforesis SDS-PAGE.

Se utilizaron geles con dos zonas diferenciadas: la zona en la que se concentran las muestras denominada gel de concentración (4% de acrilamida-bis-acrilamida, 166 mM de Tris HCl, pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,3% de persulfato amónico y 0,0005% de N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina) y el gel de separación compuesto por 7-12% acrilamida-bis-acrilamida, 1 M de Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato amónico y 0,0008% de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Esta concentración de proteínas es adecuada para separar proteínas que se encuentran en un intervalo de entre 10 y 200 KDa.

De los homogenados totales obtenidos de los tumores de ratón y de proteínas de cultivos celulares, se separaron 20 µl que se utilizaron para la determinación de proteínas totales según el método BCA. El resto de cada una de las muestras se mezcló con el tampón de carga de electroforesis 10X (120 mM de Tris-HCl pH

6.8, 10% de β -mercaptoetanol, 2% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol, 50% de glicerol). Finalmente, las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Las muestras se sometieron a electroforesis a 120 V, durante 100 minutos aproximadamente. El tampón de electroforesis estaba compuesto por 0,3% de tris base, 1,44% de glicina, y 0,1% de SDS, pH 8,6. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*GE Healthcare*, Kent, Reino Unido). La transferencia se realizó en frío aplicando un amperaje constante de 400 mA durante dos horas con un tampón compuesto por 0,31% de tris base, 1,44% de glicina y 20% de metanol, pH 8,6. Una vez finalizada la transferencia las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en TTBS (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, Tween 20 0,05%) durante una hora para minimizar la fijación inespecífica del anticuerpo. Una vez bloqueadas las membranas, éstas se incubaron en movimiento suave con el anticuerpo primario, frente a la proteína de interés, diluido en la solución de bloqueo, a las concentraciones especificadas en la Tabla 4, a 4°C, durante toda la noche. Posteriormente se realizaron tres lavados de diez minutos con TTBS y se incubaron durante una hora con los anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido), diluidos en la solución de bloqueo a una concentración de 1:2000. Finalmente se lavaron las membranas con TTBS tres veces durante 10 minutos. La inmunoreactividad se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia. Para ello se empleó el reactivo ECL (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido) con el que se incubaron las membranas de nitrocelulosa durante 1 minuto. La quimioluminiscencia se detectó al poner en contacto las membranas de nitrocelulosa con una película fotográfica ECL Hyperfilm™ (*Amersham Internacional - GE Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido).

Las películas fotográficas se escanearon con una resolución de 600 ppi y se analizaron con el programa TotalLab v2005 (Nonlinear Dynamics, All Saints, Reino Unido), obteniéndose así los valores de densidad óptica integrada (DOI) de cada una de las bandas.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot

Anticuerpo	Fosforilación	Isotipo	Casa comercial	Dilución
Akt		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
Akt	Ser 473	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
Akt	Thr 308	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
Atg5		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
CDK2		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
CDK4		Ratón IgG1	Cell Signaling	1:1000
CDK6		Ratón IgG1	Cell Signaling	1:1000
Ciclina D1		Ratón IgG1	BD Biosciences	
Ciclina D3		Ratón IgG	BD Biosciences	1:1000
Ciclina E		Ratón IgG	BD Biosciences	1:1000
EGFR		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
EGFR	Tyr1173	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
ERK 1/2		Conejo IgG	Santa Cruz	1:1000
ERK 1/2	Thr202/Tyr204	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
FoxO1		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
Glutamina Sintetasa		Ratón IgG	Chemicon	1:2500
LC3B		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
MEK		Ratón IgG	Cell Signaling	1:1000
MEK	Ser217/Ser221	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
p21		Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
p27		Conejo IgG	Abcam	1:1000
PDK1	Ser 241	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000
PTEN	Ser 380	Conejo IgG	Cell Signaling	1:1000

2.6. Inmunohistoquímica

Las muestras de tumores de ratones control y tratados (Apartado 2.2.1.) se procesaron mediante técnicas histológicas (fijación, inclusión, microtomía y montaje) para su posterior estudio mediante el microscopio óptico.

Las muestras de tumores se obtuvieron en el momento de la disección del animal e inmediatamente se sumergieron en formol al 4% (tamponado con fosfatos a pH: 7-7,5), dejándolos un mínimo de 24 horas en el fijador antes de ser incluidos en parafina. Posteriormente, los bloques de tejido fueron cortados con un micrótopo de rotación (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania*) obteniéndose cortes finos del material biológico de entre 1 y 10 μm .

2.6.1. Tinción de las muestras con hematoxilina y eosina

Una vez obtenidos los cortes, las muestras fueron desparafinadas lavándolas tres veces en xileno durante tres minutos y se rehidrataron con lavados de dos minutos de concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 80%, 70%). Finalmente se lavaron con H₂O destilada durante cinco minutos. Posteriormente, las muestras se tiñeron introduciendo los portaobjetos en hematoxilina (*Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO*) durante 10 minutos. A continuación, se introdujeron en agua del grifo durante 5 minutos y se contrastaron con alcohol ácido. Tras un paso rápido en agua destilada se sumergieron en eosina (*Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO*) durante 4 minutos. Para su montaje, las muestras fueron deshidratadas mediante lavados de tres minutos con etanol en concentraciones crecientes (70%, 96% y 100%) y se montaron de forma permanente con medio de montaje definitivo *VectaMount (Vector laboratories, Burlingame, CA)* y un cubreobjetos para ser analizados mediante microscopía óptica.

2.6.2. Marcaje de muestras de tumores de ratón con anticuerpos

Los bloques de tumores de ratones controles y tratados (ver apartado 2.2.1) se incluyeron en parafina, se desparafinaron y se hidrataron (ver apartado 2.6.1). Finalmente se realizó un último lavado con TBS 0,1 M a 4°C. A continuación se fijó la muestra durante 10 minutos en una solución 90:10 de Acetona/Metanol y se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS 0,1 M. Posteriormente se

desenmascararon los epítomos, llevando a ebullición los portaobjetos con tampón citrato pH 6,0, durante 10 minutos. Una vez atemperada, la muestra se lavó con TBS 0,1 M y H₂O destilada y se procedió al bloqueo de las peroxidasas endógenas, con H₂O₂ al 3% durante 7 minutos. Seguidamente los cortes se bloquearon mediante una solución de BSA al 1% en TBS-Triton 1% durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 5, durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron con TBS y se incubaron con el *kit* DAB substrate (*Abcam*, Cambridge, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina durante 2 minutos para la visualización de los núcleos y se rehidrataron mediante lavados de dos minutos con concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) y un lavado final con xileno. Finalmente, se montaron con medio de montaje definitivo *VectaMount* (*Vector laboratories*, *Burlingame*, *CA*). El control negativo se obtuvo sin añadir el anticuerpo primario a la preparación.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la detección de anticuerpos en tejido parafinado de tumores mediante inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Fosforilación	Isotipo	Casa comercial	Dilución
EGFR	Tyr1173	Conejo IgG	Cell Signaling	1:150
HuNu		Conejo IgG	Millipore	1:400
p21		Conejo IgG	Cell Signaling	1:50
p27		Conejo IgG	Abcam	1:150

2.7. Microscopía de fluorescencia confocal

Las células se sembraron en cámaras de cultivo de 8 pocillos acopladas a un portaobjetos (Millicell EZ slide, Millipore) a una densidad de 10000 células/pocillo. 24 h después de la siembra se incubaron en presencia o ausencia de Minerval a una concentración de 200 μ M.

Posteriormente, las células se lavaron con PB 0,1 M (NaH_2PO_4 20 mM, Na_2HPO_4 80 mM pH 7,4) y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación se lavaron las células dos veces durante 5 minutos con PB y se realizó un último lavado con TBS de 10 minutos. Para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo, las células se incubaron durante 60 minutos con una solución de suero de caballo al 5% en TBS. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-FoxO1 (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA) a una concentración de 1:100 o anti-RAS (*Cell Signaling Technology*, Danvers, MA) a una concentración de 1:50 disueltos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en una atmósfera húmeda. El control negativo se mantuvo toda la noche con la solución de bloqueo sin anticuerpo primario. A continuación se descartó el anticuerpo primario y las células se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS. Tras los lavados, las células se incubaron en oscuridad durante una hora con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 Cabra anti-conejo IgG (*Invitrogen SA*, El Prat de Llobregat, Spain) diluido en una solución de suero de caballo al 5% en TBS (1:200). Posteriormente las células se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS añadiendo al último lavado Hoechst 33258 (*Invitrogen SA*, El Prat de Llobregat, Spain) para teñir los núcleos o un marcador de membrana plasmática (Vibrant Lipid Raft Labeling Kit 594, *Invitrogen SA*, El Prat de Llobregat, Spain). Finalmente, se separaron los portaobjetos de las cámaras de cultivo y se procedió a su montaje con medio acuoso para fluorescencia (*Sigma-Aldrich Chemie*, Munich, Alemania). Las muestras se observaron en un microscopio confocal Laser Leica TCS SPE (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemania) con el que se capturaron series de imágenes con 0,2 μ m de separación. Los resultados obtenidos se procesaron y cuantificaron utilizando el programa *Leica LAS AF Lite* (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemania).

2.8. Microscopía electrónica

Para el estudio morfológico de células SF-767 controles y tratadas con Minerval, éstas se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo en cámaras de Permanox de 4 pocillos (Nunc International, Naperville, IL). Tras 24 horas, las células se trataron con Minerval a diferentes concentraciones (150, 200 y 400 μM) y tiempos (24, 48, 72, 96 y 120 h). Después del tratamiento, se lavaron tres veces durante cinco minutos con PB 0,1 M y se fijaron con glutaraldehído al 3,5% durante una hora a 37°C y se lavaron tres veces durante diez minutos con PB 0,1 M. Posteriormente se post-fijaron en OsO₄ al 2% durante una hora a temperatura ambiente y se realizaron lavados de 5 minutos con etanol a concentraciones crecientes del 30 al 70%. Las muestras se tiñeron en oscuridad con acetato de uranilo al 2% durante 2 horas a 4°C y se deshidrataron con lavados de cinco minutos con concentraciones crecientes de etanol (70-100%). Las muestras deshidratadas, se incluyeron durante toda la noche en Araldita (*Fluka*, Buchs SG, Suiza) y se realizaron cortes semifinos de 1,5 μm con un ultramicrotomo Ultracut UC-6 (*Leica*, Heidelberg, Alemania). De las secciones semifinas seleccionadas se obtuvieron secciones ultrafinas de 0,06-0,09 μm , que se tiñeron con citrato. Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión (FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin) acoplado a una cámara digital (*Olympus*, Soft Imaging System, Barcelona, España).

2.9. Análisis de datos

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM) de el número de animales indicado (N) y de al menos tres experimentos independientes en los resultados de experimentos *in vitro* con células.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0. Los grupos se compararon utilizando análisis de la varianza (ANOVA) o un análisis *t-student* seguido de un test de Bonferroni.

Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0.05$. Las diferentes significancias se representaron como: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

3. OBJETIVOS

El planteamiento general de esta tesis doctoral se dirige hacia la investigación de los efectos farmacológicos del Minerval en el cáncer de pulmón no microcítico y en el glioma. Por ello se estudiaron las bases moleculares del efecto del Minerval *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, en modelos celulares y animales de estos dos tipos de cáncer humano.

Los objetivos concretos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Investigar *in vivo* los efectos de la administración oral del Minerval en ratones desnudos inoculados con células de glioma humano SF-767 y cáncer de pulmón no microcítico A549.
2. Investigar el efecto del Minerval sobre el ciclo celular, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Estudiar la vía de señalización celular EGFR-Akt-FoxO1.
3. Investigar el efecto del Minerval sobre la diferenciación celular *in vivo* y *ex vivo*. Estudiar la vía de señalización celular MAPKs.
4. Investigar posibles mecanismos de muerte celular en tratamientos con Minerval.
5. Investigar la posible toxicidad del Minerval con: estudios citohistológicos en xenotrasplantes de células de glioma humano SF-767 y cáncer de pulmón no microcítico humano A549, así como estudios regulatorios de toxicidad en ratón, rata y perro.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto del Minerval sobre la progresión de xenotrasplantes en ratones inmunodeprimidos

Se investigó el efecto crónico del Minerval sobre la progresión de xenotrasplantes de células de glioma humano SF-767. Para ello se midió el volumen del tumor durante 50 días de tratamiento tal y como se describe en el apartado 2.2.2. de la sección de Materiales y Métodos.

Para determinar la efectividad oral del Minerval, se utilizaron ratones desnudos (inmunodeprimidos, NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu}) inoculados subcutáneamente con $7,5 \cdot 10^6$ células SF-767 y se trataron con distintas dosis de Minerval (200, 400 y 600 mg/Kg) disuelto en trioleína con una posología de 24 horas, vía oral (p.o.). Se observó un efecto dosis-dependiente, estableciendo un margen terapéutico entre 400 y 600 mg/Kg de Minerval (Figura 16 A). Los grupos de ratones inmunodeprimidos tratados con 200, 400 y 600 mg/Kg de Minerval, presentaron al final del tratamiento un volumen de tumor de $1218 \pm 165 \text{ mm}^3$, $399 \pm 82 \text{ mm}^3$ y $339 \pm 113 \text{ mm}^3$, respectivamente. El grupo de ratones inmunodeprimidos control tratado con el vehículo (trioleína) presentó un volumen de tumor al final del tratamiento de $3010 \pm 392 \text{ mm}^3$ (Figura 16 A).

Se estableció como dosis terapéutica 600 mg/Kg de Minerval y se comparó con esta dosis la eficacia vía oral del Minerval en forma de ácido libre, sal de amonio o sal sódica (Figura 16 B).

Las tres formulaciones de Minerval redujeron significativamente el volumen del tumor respecto al grupo control, presentando al final del tratamiento un volumen de tumor de $463 \pm 64 \text{ mm}^3$, $510 \pm 166 \text{ mm}^3$ y $346 \pm 124 \text{ mm}^3$, respectivamente. El grupo control tratado con el vehículo presentó al final del tratamiento un volumen de tumor de $2348 \pm 350 \text{ mm}^3$ (Figura 16 B).

Se estableció como dosis terapéutica en todos los tratamientos vía oral 600 mg/Kg de Minerval en forma de sal sódica.

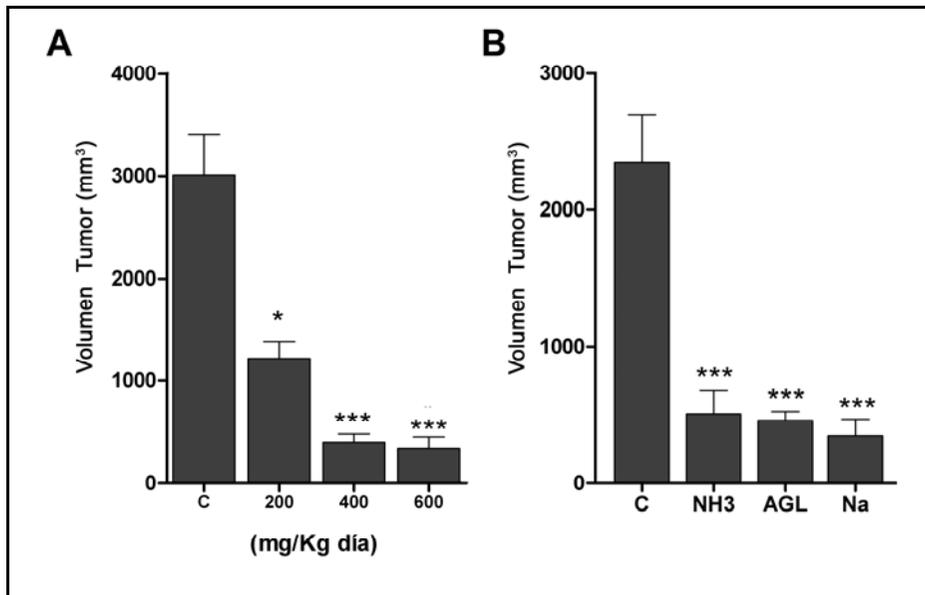


Figura 16. A: Eficacia oral de las distintas dosis de Minerval en la progresión de xenotrasplantes de glioma humano (SF-767). Los ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral dosis de 200, 400 y 600 mg/Kg de Minerval cada 24 horas, durante 50 días. El grupo control (C) recibió vehículo (trioleína). **B:** Eficacia oral de diferentes formulaciones de Minerval en la progresión de xenotrasplantes de glioma humano SF-767. Los ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral 600 mg/Kg de Minerval cada 24 horas durante 50 días en forma de sal de amonio (NH₃), ácido graso libre (AGL) o sal sódica (Na). El grupo control (C) recibió vehículo (trioleína). El volumen del tumor (expresado en mm³) se midió como se describe en el apartado 2.2.2. de Materiales y Métodos. Cada columna representa la media±EEM de 10 animales por grupo. *p<0.05, ***p<0.001

4.2. Efecto del Minerval sobre células de glioma humano (SF-767)

4.2.1. Efecto del Minerval en la progresión de xenotrasplantes de la línea celular de glioma humano (SF-767) en ratones inmunodeprimidos

A continuación se estudió el efecto *in vivo* de la administración crónica (50 días) del Minerval y del quimioterápico de referencia en el tratamiento del glioma, la Temozolomida (TMZ). La administración oral de Minerval (600 mg/Kg) y de TMZ (80 mg/Kg) en ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu}, redujeron significativamente el volumen del tumor, respecto al grupo control (vehículo), a partir del día 20 de tratamiento (144 ± 52 mm³, 296 ± 76 mm³ y 764 ± 202 mm³, respectivamente) (Figura 18). Al final del tratamiento el grupo de ratones tratados con el vehículo (trioleína), presentaba un incremento en el volumen del tumor respecto al grupo de ratones tratados con Minerval (600 mg/Kg) y Temozolomida (80 mg/Kg) de un 91,1% y un 40,5%, respectivamente, siendo el volumen final del tumor en ratones tratados con el vehículo de 2431 ± 470 mm³, en ratones tratados con Minerval de 217 ± 104 mm³ y en ratones tratados con Temozolomida de 1446 ± 172 (Figura 17 y 18).

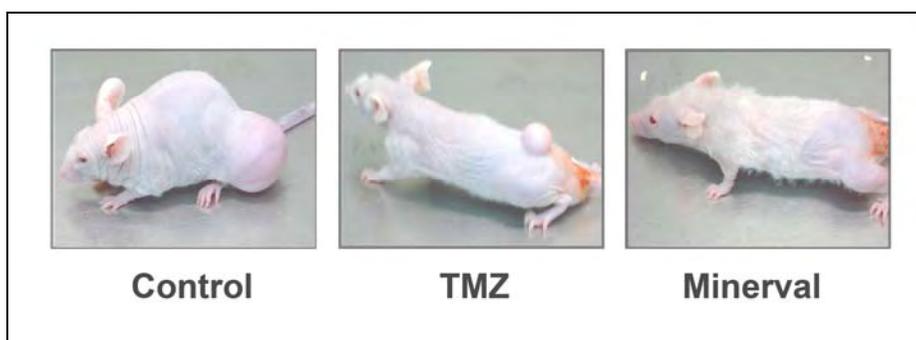


Figura 17. Fotografías representativas de xenotrasplantes en ratones desnudos inoculados con $7,5\cdot 10^6$ células SF-767 después de 50 días de tratamiento. Los ratones recibieron por vía oral TMZ (80 mg/Kg), Minerval (600 mg/Kg) y vehículo (Control).

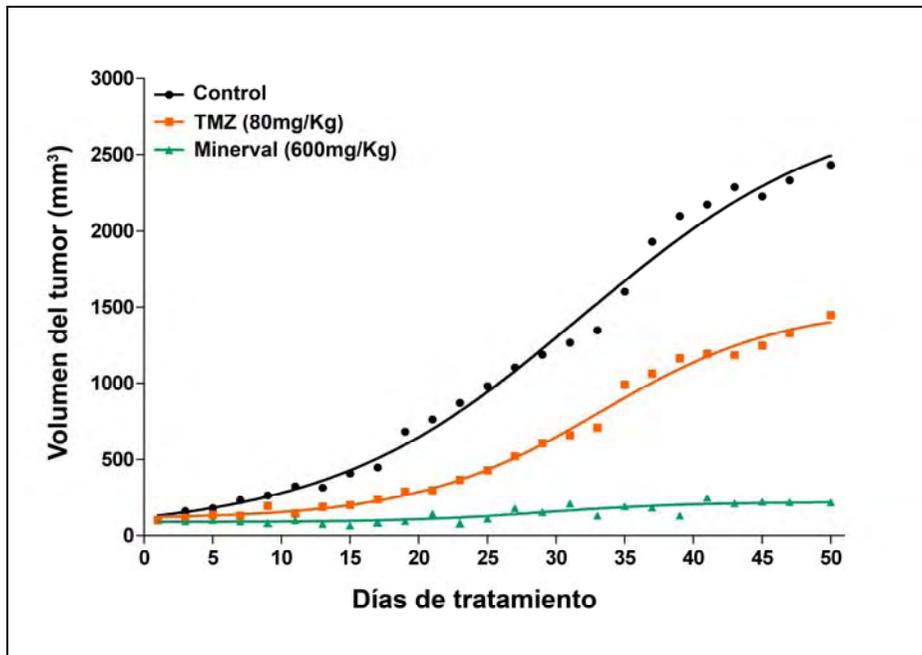


Figura 18. Efecto crónico del tratamiento con Minerval y Temozolomida (TMZ) sobre la progresión de xenotrasplantes de glioma humano (SF-767). Los ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral vehículo (trioleína), Minerval (600 mg/Kg) y TMZ (80 mg/Kg) cada 24 horas durante 50 días. El volumen del tumor (expresado en mm³) se midió como se describe en el apartado 2.2.2. de la sección de Materiales y Métodos. Cada valor representa la media de 15 a 20 animales por grupo.

4.2.2. Estudio de recidiva y terapia combinada en tratamientos con Minerval y Temozolomida

Se estudió *in vivo* la recidiva de xenotrasplantes en ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} inoculados subcutáneamente con $7,5 \cdot 10^6$ células SF-767, tratados por vía oral con 600 mg/Kg de Minerval, 80 mg/Kg de Temozolomida cada 24 horas o en terapia combinada con 600 mg/Kg de Minerval y 80 mg/Kg de Temozolomida, durante 50 días.

Los ratones tratados con terapia combinada de Minerval (600 mg/Kg) y Temozolomida (80 mg/Kg) presentaron el día 50 de tratamiento, una reducción del volumen del tumor de aproximadamente un 90% respecto al

grupo control (vehículo) (Figura 19) y no presentaron recidiva después de 21 días sin tratamiento (Figura 20).

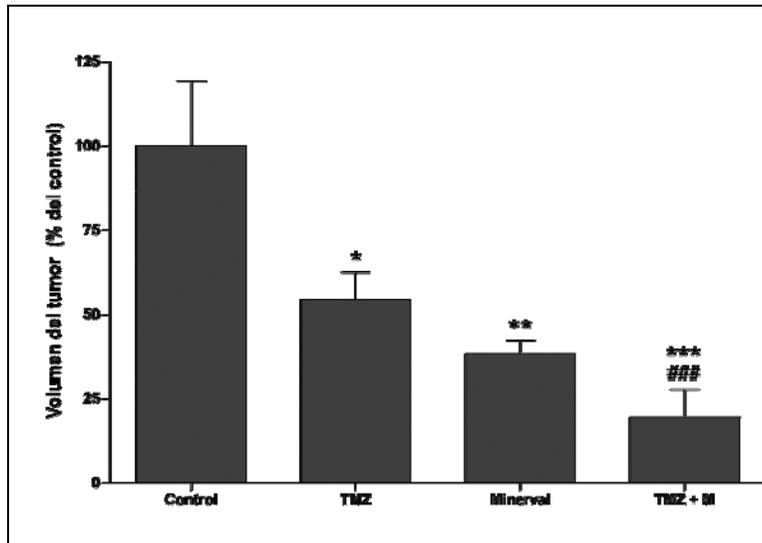


Figura 19. Efecto crónico del tratamiento con Temozolomida, Minerval y la terapia combinada de Minerval y Temozolomida en la progresión de xenotrasplantes de glioma humano (SF-767). Los ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral vehículo (trioleína), Minerval (600 mg/kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y la combinación de Minerval (600 mg/kg) y Temozolomida (80 mg/Kg) cada 24 horas durante 50 días. El volumen del tumor se midió como se describe en el apartado 2.2.2. de Materiales y Métodos. Cada columna representa la media±EEM de 10 animales por grupo expresados en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$.

Para el estudio de recidiva, se escogieron ratones que presentaron durante las dos últimas semanas de tratamiento (del día 36 al día 50) un volumen de tumor de entre el 30% y el 35% respecto a los controles. La medida del volumen del tumor se prolongó 21 después de finalizar el tratamiento con Minerval, Temozolomida y la terapia combinada entre Minerval y Temozolomida. Durante este periodo los ratones no recibieron ningún tratamiento. Después de estos 21 días sin tratamiento, se observó en el grupo de ratones tratados con Temozolomida (80 mg/Kg) un incremento del

volumen del tumor de aproximadamente un 35%. Los ratones tratados con Minerval (600 mg/Kg) no presentaron recidiva después de la finalización del tratamiento.

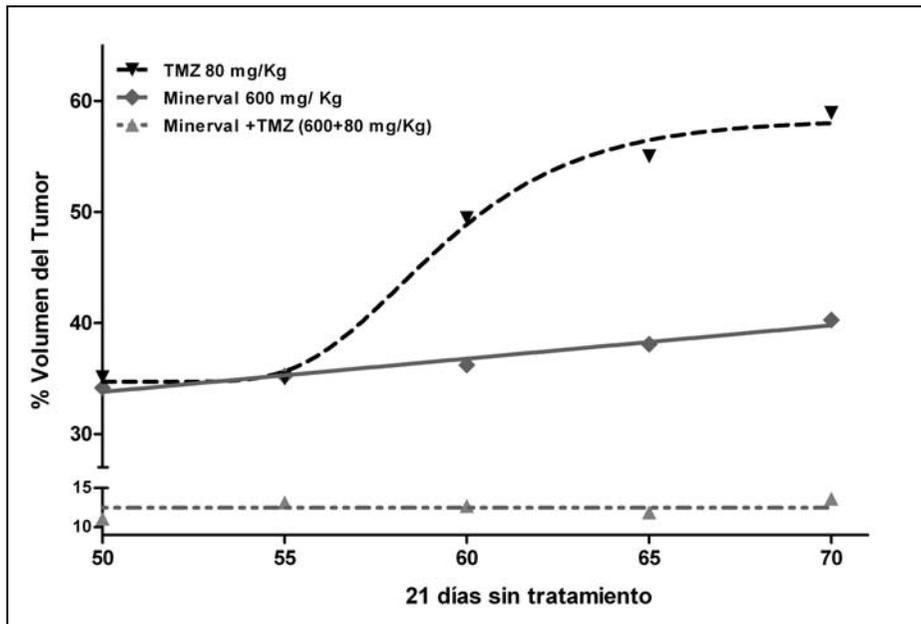


Figura 20. Progresión de xenotrasplantes de glioma humano (SF-767) en recidiva, después de 21 días sin tratamiento. Los ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral vehículo (trioleína), Minerval (600 mg/kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y la combinación de Minerval (600 mg/kg) y Temozolomida (80 mg/Kg) cada 24 horas durante 50 días y no se trataron los 21 días posteriores. El volumen del tumor se midió tal y como se describe en el apartado 2.2.2. de Materiales y métodos. Cada valor representa la media de 10 animales por grupo expresados en % respecto al control (tomado como 100%).

4.2.3. Estudio citohistológico de xenotrasplantes de la línea celular de glioma humano (SF-767)

Se realizó una tinción hematoxilina/eosina de cortes histológicos de tumores subcutáneos inducidos por la inoculación de $7,5 \cdot 10^6$ de células SF-767 en ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu}. Los distintos cortes histológicos fueron analizados por microscopía óptica. En todos los casos se observó una

masa tumoral maligna con diferenciación escamosa (Figura 21). En tejidos de ratones tratados con Minerval (600 mg/Kg) cada 24 horas durante 50 días, se observó un área ampliamente necrótica (B). En tejidos de ratones tratados con vehículo (Control) o Temozolomida (80 mg/Kg) se observó una extensa área de células viables (A) (Figura 21).

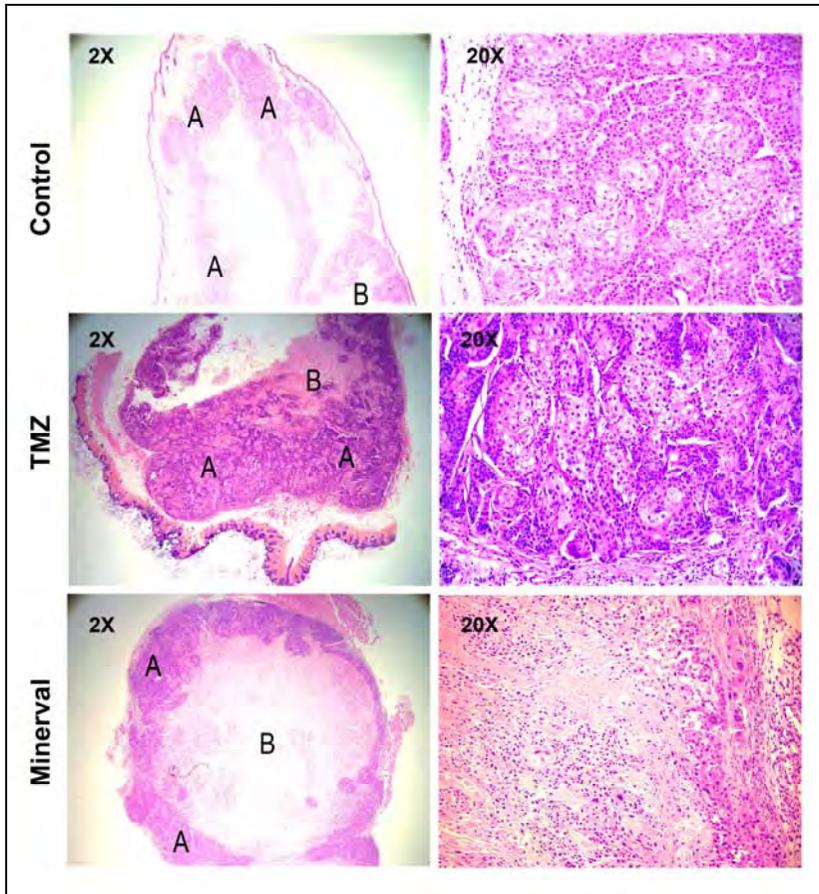


Figura 21. Cortes histológicos representativos de xenotrasplantes de células SF-767 en ratones NUDE Swiss Crl:NU(lco)-Foxn1^{nu} tratados por vía oral cada 24 horas con vehículo (Control), Temozolomida (80 mg/Kg) y Minerval (600 mg/Kg). En el panel de la izquierda (2X): Zonas viables (A) y zonas necróticas (B). En el panel de la derecha (20X): detalle de núcleos de células viables y no viables en los tumores de ratones tratados con vehículo (Control), Temozolomida y Minerval.

4.2.4. Efecto del Minerval en un modelo ortópico de células de glioma humano (SF-767) en ratones desnudos

Se indujo analgesia en ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu}, 48 horas anteriores a la intervención quirúrgica. Los animales se anestesiaron tal y como se describe en el apartado 2.2.3. de Materiales y Métodos. Se inocularon $2 \cdot 10^4$ células SF-767 en un volumen total de 3 μ l en el hemisferio derecho de ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} en las coordenadas +0,5 mm R/C (Rostro-Caudal), -1,75 mm M/L (Medio-Lateral) y -3mm D/V (Dorso-Ventral) mediante la técnica quirúrgica de estereotaxia. Los ratones se trataron por vía oral con 600 mg/Kg de Minerval o 80 mg/Kg de Temozolomida cada 24 horas durante 42 días. El estudio inmunohistoquímico mostró la desaparición de los tumores en el 50% de los cuatro ratones tratados con Minerval (n=2/4). Los tumores de los ratones tratados con Minerval presentaron una menor reactividad celular en la zona de implante, una astrocitosis moderada y una disminución muy marcada en el número de células tumorales respecto a los ratones control, agrupadas en pequeñas masas. En los ratones tratados con Temozolomida (n=4) se observaron masas tumorales compactas y algunas células aisladas en la vecindad ventricular. En estas muestras se observó astrocitosis moderada y microglía parcialmente activa.

El grupo de ratones tratados con vehículo (trioleína, n=4), presentaron tumores con clústeres de células tumorales y numerosas cavitaciones en la cercanía de las masas tumorales así como abundantes células en la cavidad ventricular. Se observó una intensa astrocitosis y microgliosis. Los tumores presentaron un área media mayor respecto a los tratados con Minerval y un mayor número de células positivas para el marcador de núcleos humanos (HuNu⁺) (Figuras 22 y 23).

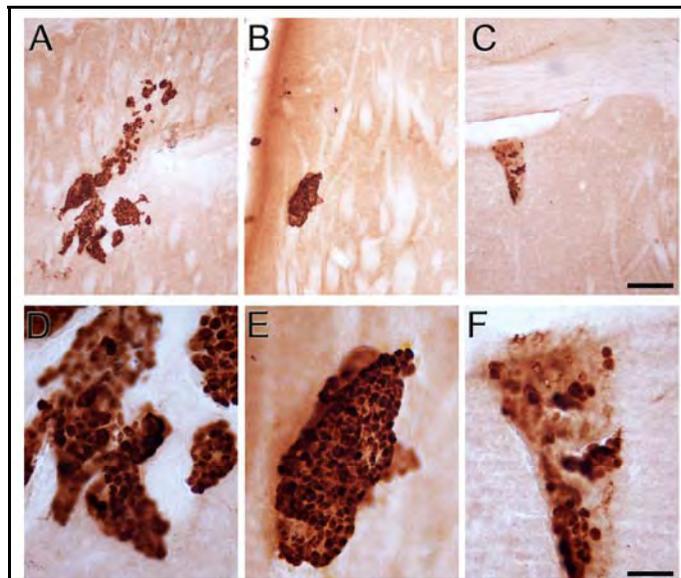


Figura 22. Efecto del vehículo (A, D), TMZ (B, E) y Minerval (C, F) en un modulo ortópico de glioma Humano (SF-767). Los ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron vía oral con 600 mg/Kg de Minerval y 80 mg/Kg de Temozolomida cada 24 horas durante 42 días. Barra= 200 μm (A-C), 50 μm (D-F)

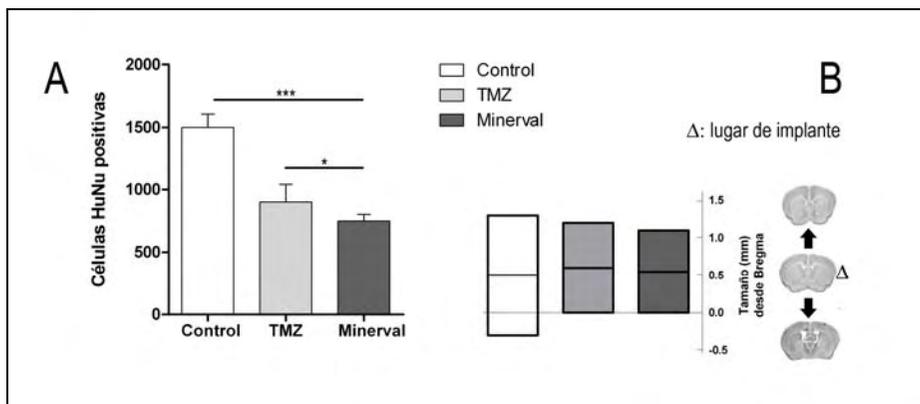


Figura 23. A: Células positivas para el antígeno nuclear humano (HuNu⁺). B: Distribución de células HuNu⁺ en el cerebro de los ratones (mm desde el punto de referencia Bregma). Los ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron vía oral con 600 mg/Kg de Minerval y 80 mg/Kg de Temozolomida cada 24 horas durante 42 días. Cada valor representa la media±EEM de 4 animales por grupo. *p<0.05. TMZ: Temozolomida

4.2.5. Minerval induce la parada del ciclo celular en células (SF-767)

Se estudió el efecto del Minerval sobre el ciclo celular en la línea SF-767. Las células se sembraron a una densidad de $1 \cdot 10^4$ células/cm² y se trataron con 150 y 200 μ M de Minerval durante 48 horas. Posteriormente se analizaron las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, observándose una acumulación de células en la fase G1 en células tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval, presentando un porcentaje de células en G1 de $74,07 \pm 0,84\%$ y $77,69 \pm 0,56\%$, respectivamente, respecto a células no tratadas $63,21 \pm 0,90\%$. Este resultado indica una parada del ciclo celular en la fase G1 (Figura 24).

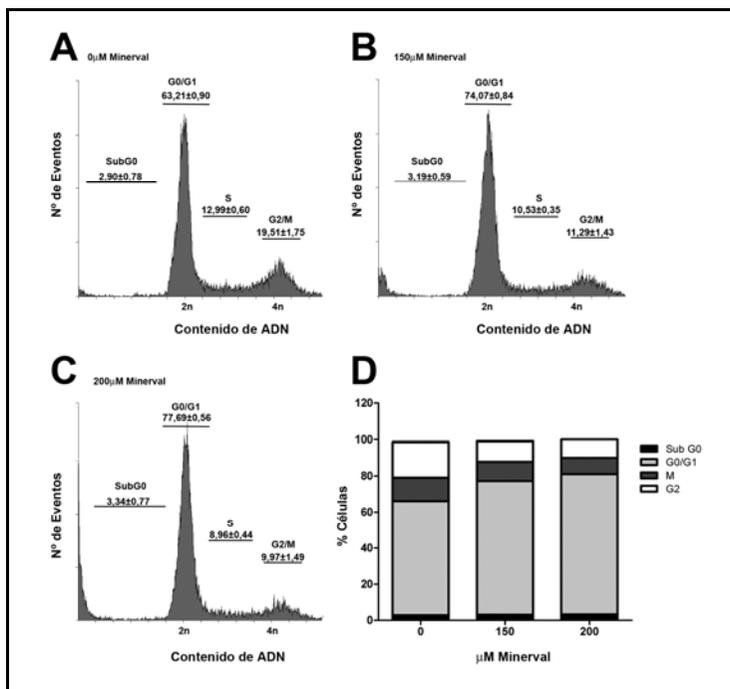


Figura 24. Efecto del Minerval sobre el ciclo celular. A,B y C: Contenido de ADN en células SF-767 incubadas con 150 y 200 μ M de Minerval y sin Minerval durante 48 horas. De izquierda a derecha, los valores indicados corresponden al porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo: Sub G0, G0/G1, S y G2/M. **D: porcentaje total de células en cada fase del ciclo.** Cada valor representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas.

4.2.6. Efecto del Minerval sobre los niveles de proteínas CDK 2, 4 y 6 y Ciclinas D1, D3 y E en células de glioma humano (SF-767)

Para corroborar la parada de ciclo en G1 se realizaron tratamientos a diferentes tiempos (24 y 48 horas) y concentraciones de 150 y 200 μM de Minerval. Para ello se midieron los niveles de varias proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular en la fase G1 y S, como las ciclinas D1, D3 y E y las CDK 2, 4 y 6. Las proteínas, se detectaron y cuantificaron por técnicas inmunológicas como se describe en el apartado 2.4.4. de la sección de Materiales y Métodos.

Se observó una reducción significativa de aproximadamente un 67% en los niveles de la proteína CDK4 en células tratadas con 200 μM de Minerval 24 y 48 horas de tratamiento, respecto a células no tratadas. Los niveles de CDK 6 disminuyeron significativamente aproximadamente un 50% a 24 y 48 horas de tratamiento en células tratadas con 200 μM de Minerval respecto a células no tratadas. CDK2 disminuyó su expresión aproximadamente un 50% a concentraciones de 150 y 200 μM de Minerval a 24 horas de tratamiento respecto a células no tratadas. Asimismo, CDK2 disminuyó su expresión aproximadamente un 30% a 48 horas de tratamiento respecto a células no tratadas (Figura 25).

A continuación se investigaron los niveles de las ciclinas D1, D3 y E. Se observó una disminución significativa del nivel de la Ciclina D1 en células SF-767 tratadas con 200 μM de Minerval de un 80% a 24 y de un 50% a las 48 horas de tratamiento respecto a células no tratadas. También se observó una disminución significativa del nivel de Ciclina D3 en células tratadas durante 24 y 48 horas con 150 y 200 μM de Minerval de entre un 70% y un 80% respectivamente respecto a células no tratadas. Finalmente se observó que el nivel de Ciclina E disminuyó significativamente en células tratadas con 150 y 200 μM de Minerval en más de un 40%, 24 horas después del tratamiento y entre un 55 y 65% en células tratadas con 200 μM de Minerval durante 24 y 48 horas (Figura 25).

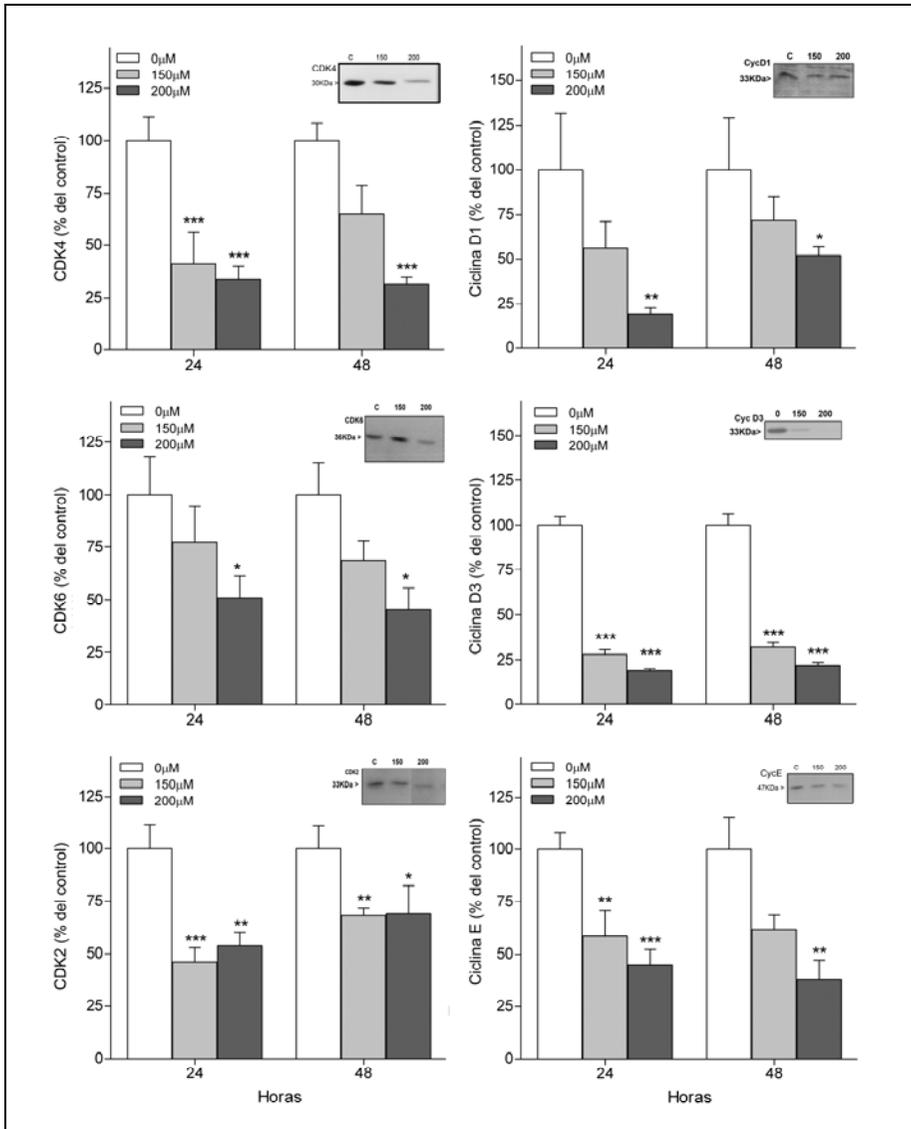


Figura 25. Efecto del tratamiento con Minerval sobre los niveles de expresión de las proteínas CDK 2, 4 y 6 y las Ciclinas D1, D3 y E. Las células de glioma humano SF-767 se trataron con 150 y 200 μ M de Minerval durante 24 y 48 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a las células no tratadas (tomadas como 100%). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

4.2.7. Efecto del Minerval sobre los niveles de proteínas CDK 2, 4 y 6 y Ciclinas D1, D3 y E en xenotrasplantes de células de glioma humano (SF-767)

Se investigaron los mecanismos moleculares implicados en la parada del ciclo celular en la fase G1, en tumores derivados de células de glioma humano SF-767 implantadas en ratones NUDE Swiss CrI:NU(Ico)-Foxn1^{nu}, tratados con 600 mg/Kg de Minerval, 80 mg/Kg de Temozolomida y vehículo (trioleína), cada 24 horas durante 50 días. Para ello se midieron en los tumores, los niveles de expresión de las proteínas CDKs 2, 4 y 6 y las ciclinas D1, D3 y E. Los análisis mostraron que el tratamiento con Minerval disminuyó significativamente los niveles de inmunoreactividad de las proteínas CDKs 2, 4 y 6 en un 55%, 70% y 35% respectivamente y de las Ciclinas D1, D3 y E en un 45%, 35% y 60%, respectivamente, en tumores de ratones tratados con Minerval al compararlos con los niveles de ratones tratados con vehículo (Figura 26).

Por el contrario en tumores de ratones tratados con Temozolomida, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas CDKs ni de las ciclinas al compararlas con los niveles que presentaron ratones tratados con vehículo (Figura 26).

Los niveles de la proteína CDK4 disminuyeron significativamente en tumores de ratones tratados con Temozolomida en un 65% respecto a los niveles de los ratones tratados con vehículo (Figura 26).

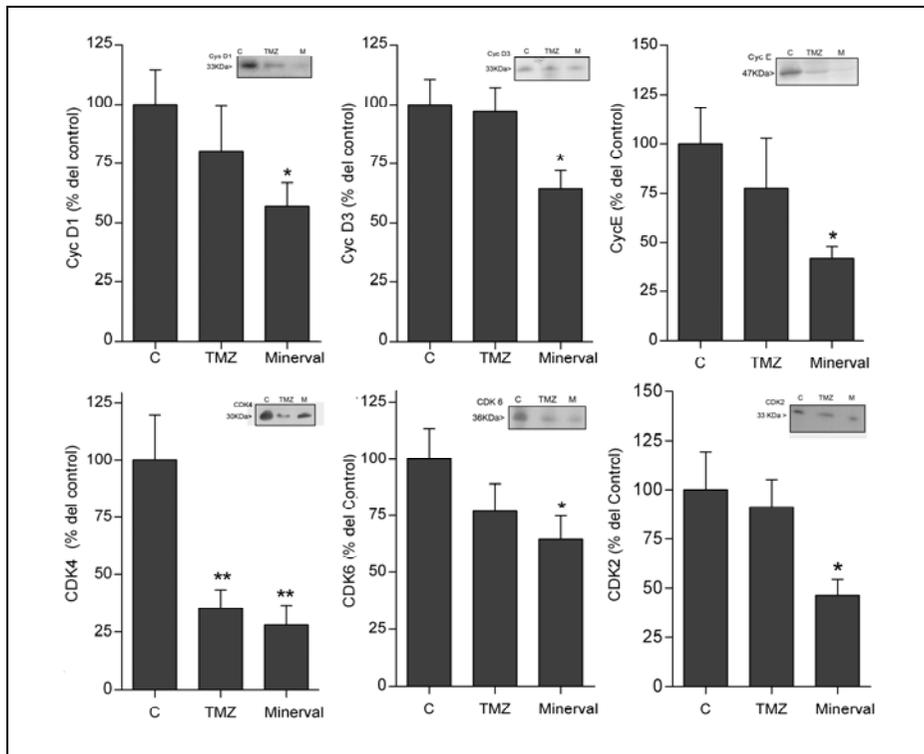


Figura 26. Efecto del tratamiento con Minerval (M) y Temozolomida (TMZ) sobre los niveles de las proteínas CDKs 2, 4 y 6 y las Ciclinas D1, D3 y E. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(1co)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral 600 mg/Kg de Minerval, 80 mg/Kg de Temozolomida y vehículo (trioleína) (C) cada 24 horas durante 50 días. Cada columna representa la media±EEM de 10 ó 15 muestras expresadas en porcentaje respecto al control (Tomado como 100%).*p<0.05, **p<0.01.

4.2.8. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en células de glioma humano (SF-767)

Se analizaron los niveles de expresión de proteínas CKIs reguladoras del ciclo celular, p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, en células de glioma humano SF-767. La expresión de p21^{CIP1} se incrementó en células SF-767 tratadas con 150 μM de Minerval durante 24 horas (159±31%) respecto a células no tratadas. Cuando se trataron células SF-767 con 200 μM de Minerval durante 24 y 48 horas, los niveles de p21^{CIP1} incrementaron aproximadamente el doble, respecto a los controles no tratados (Figura 27 A).

Los niveles de la proteína p27^{KIP1}, incrementaron su expresión proteica aproximadamente el doble en células tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 24 horas respecto a los controles, mientras que en células tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 48 horas los niveles incrementaron hasta 2,5 veces respecto a las células no tratadas (Figura 27 B).

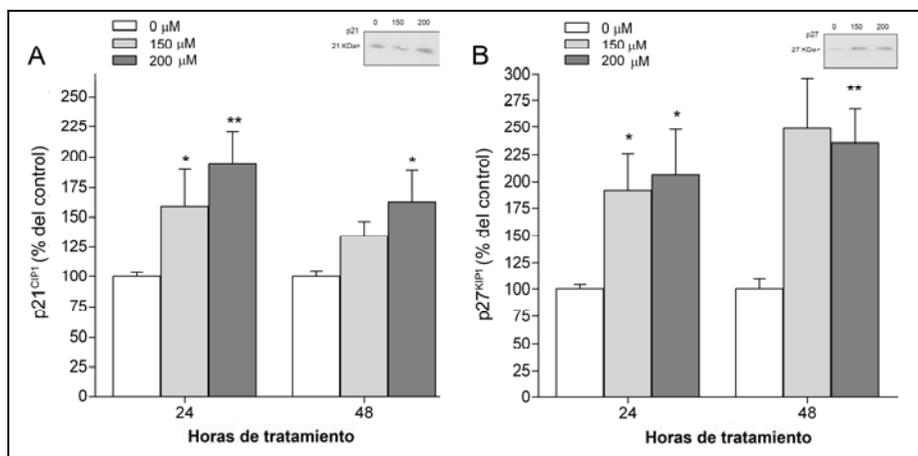


Figura 27. Efecto del tratamiento con Minerval sobre los niveles de CKIs p21^{CIP1} (A) y p27^{KIP1} (B). Las células de glioma humano SF-767 se trataron con 150 y 200 μM de Minerval durante 24 y 48 horas. Cada valor representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

4.2.9. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en xenotrasplantes de células de glioma humano (SF-767)

Se cuantificaron los niveles de los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en tumores subcutáneos inducidos con células de glioma humano SF-767 en ratones NUDE Swiss CrI:NU(Ico)-Foxn1^{nu}, tratados por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (trioleína), cada 24 horas durante 50 días.

Los tratamientos con Minerval y Temozolomida indujeron incrementos significativos de la expresión de p21^{CIP1}, que aumentaron el triple y el doble respectivamente, respecto a tumores de ratones tratados con vehículo (Figura 28 A).

Los niveles de la proteína p27^{KIP1} incrementaron más de cuatro veces su valor, en tumores de ratones tratados con Minerval al compararlos con los niveles de los ratones tratados con vehículo. En tumores de ratones tratados con Temozolomida, también se observaron incrementos en los niveles de p27^{KIP1} de más del doble respecto a los niveles de los ratones tratados con vehículo (Figura 28 A).

Además, se determinó la localización celular de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en cortes histológicos de xenotrasplantes de células de glioma humano SF-767 de ratones NUDE Swiss CrI:NU(Ico)-Foxn1^{nu}, mediante inmunohistoquímica, tal y como se describe en el apartado 2.5.2. de Materiales y Métodos. Los ratones se trataron con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (trioleína), cada 24 horas durante 50 días. Los cortes histológicos de tumores de ratones tratados con Minerval, fueron positivos para el marcaje de p21^{CIP1} y p27^{KIP1}. Además el marcaje se observó en mayor proporción en núcleos de células de tejidos de tumor de ratones tratados con Minerval respecto a ratones tratados con Temozolomida y vehículo (Figura 28 B).

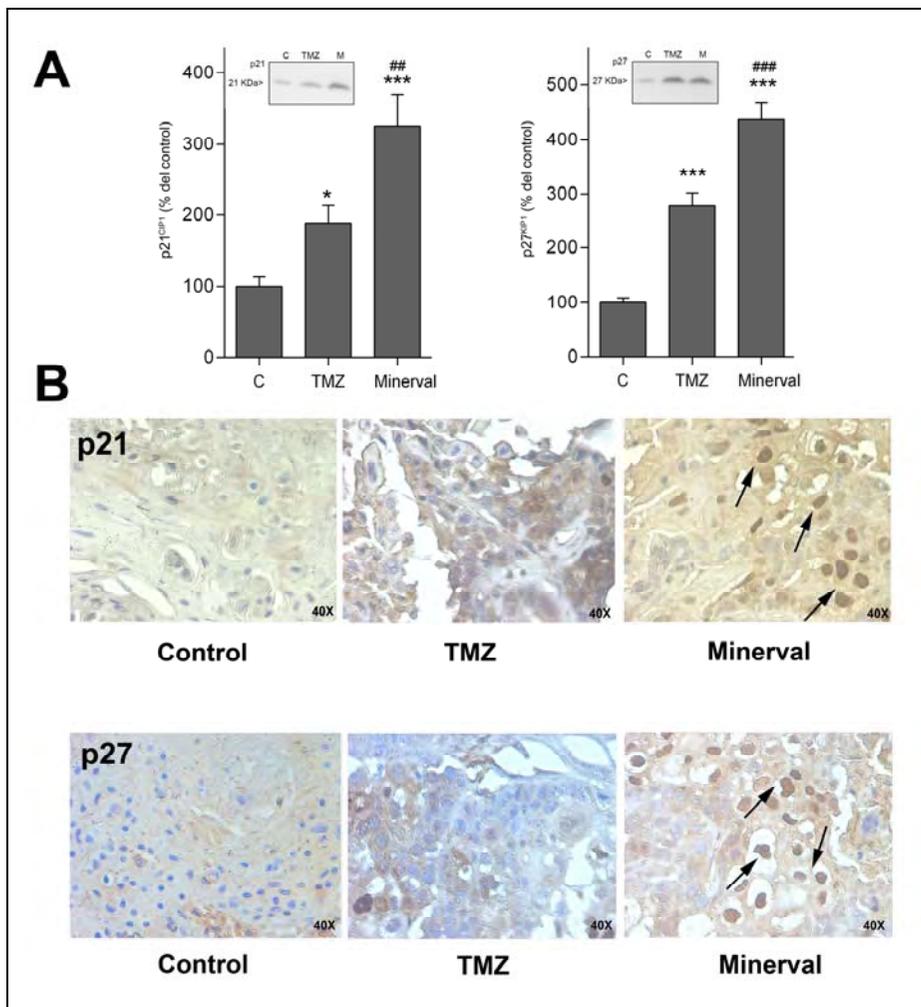


Figura 28. A: Efecto del tratamiento con Minerval y Temozolomida sobre los niveles de las proteínas p21^{CIP1} y p27^{KIP1}. Cada columna representa la media±EEM de 10 ó 15 muestras expresadas en porcentaje respecto al control (tomado como 100%).*p<0.05, ***p<0.001, ##p<0.01, ###p<0.001 **B: Inmunohistoquímica de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en cortes histológicos de xenotrasplantes inducidos con células SF-767.** Ratones NUDE Swiss CrI:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (Control) cada 24 horas durante 50 días. El marcaje antigénico de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} se observa en color marrón, los núcleos de las células se observan en color azul.

4.2.10. Efecto del Minerval sobre la vía EGFR/RAS/MAPK en células y xenotrasplantes de glioma humano (SF-767)

Se estudió el efecto del Minerval sobre las proteínas de membrana EGFR y RAS en la línea de glioma humano SF-767. EGFR y Akt se detectaron y cuantificaron mediante técnicas inmunológicas tal y como se describe en el apartado 2.4.4. de Materiales y Métodos. La distribución de RAS se observó mediante microscopía confocal tal y como se describe en el apartado 2.7. de Materiales y Métodos.

Se estudiaron los niveles de fosforilación de EGFR y Akt en células de glioma humano SF-767 tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval durante 24 horas. Las células se privaron de suero doce horas antes de su tratamiento con Minerval asegurando la especificidad de la señalización. Se preincubaron durante 24 horas con Minerval y a continuación se incubaron durante 15 minutos con EGF a una concentración de 35 nM.

El tratamiento con Minerval produjo la inhibición de la fosforilación del EGFR en el aminoácido Tyr 1173 y del residuo Ser 473 de Akt, que activan las correspondientes proteínas. La reducción de la fosforilación de EGFR fue de aproximadamente un 60% en células SF-767 tratadas con 200 μ M de Minerval durante 24 horas, respecto a las células no tratadas (Figura 29 A). Asimismo, células SF-767 tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval 24 horas, presentaron una reducción significativa de los niveles de fosforilación de Akt de aproximadamente un 70% respecto a células no tratadas (Figura 29 B).

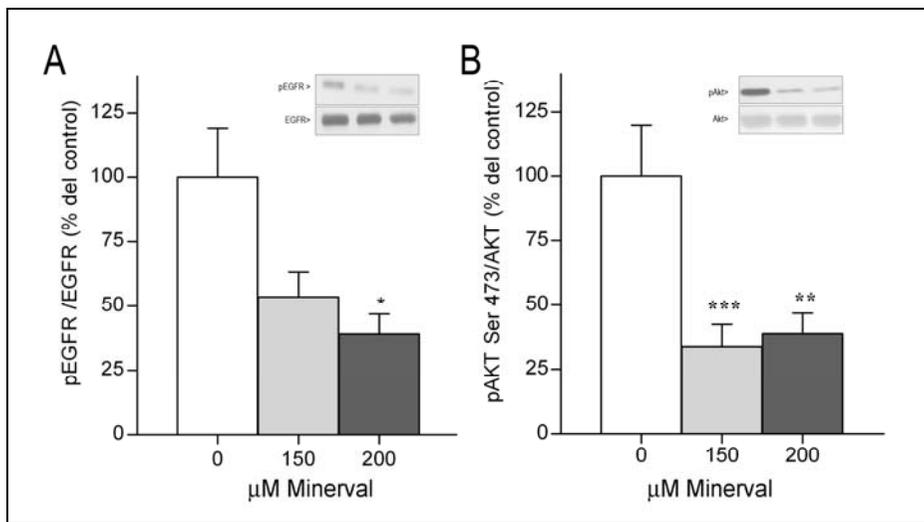


Figura 29. Efecto del tratamiento con Minerval sobre los niveles de fosforilación de EGFR (A) y Akt (B). Las células de glioma humano SF-767 se trataron con 150 y 200 μM de Minerval durante 24 horas. Cada valor representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%).* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La distribución celular de la proteína G pequeña RAS, se observó en células de glioma humano SF-767 tras diez minutos de incubación con una concentración de 150 μM de Minerval, mediante microscopía confocal. En células control (no tratadas), se observó la localización de RAS en la membrana plasmática, mientras que las células tratadas con 150 μM Minerval presentaron una redistribución de RAS en el citoplasma o el retículo endoplásmico (Figura 30).

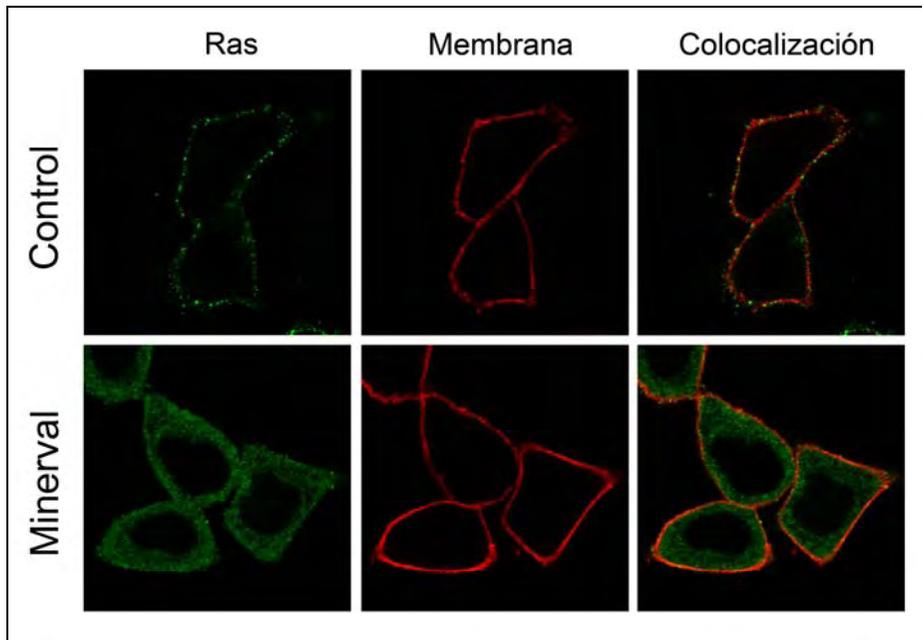


Figura 30. Redistribución de la proteína RAS en células de glioma humano SF-767. Las células se trataron con 150 μ M de Minerval durante 10 minutos. El marcaje antigénico de RAS se observa en color verde, el marcador de membrana se observan en color rojo.

Se cuantificaron los niveles de fosforilación de MEK y ERK, en tumores de ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu}.

Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (Control), cada 24 horas durante 50 días.

Se observó una disminución significativa de la fosforilación de la proteína MEK en tumores de ratones tratados con Minerval de aproximadamente un 75% respecto a ratones control. Los niveles de fosforilación de la proteína ERK, disminuyeron significativamente un 85% en tumores de ratones tratados con Minerval respecto a ratones control tratados con vehículo.

Los tumores de ratones tratados con Temozolomida, presentaron una disminución significativa del 60% de la fosforilación de MEK respecto a ratones control. No se observaron cambios significativos en los niveles de fosforilación de ERK en tumores de ratones tratados con Temozolomida respecto a ratones control (Figura 31).

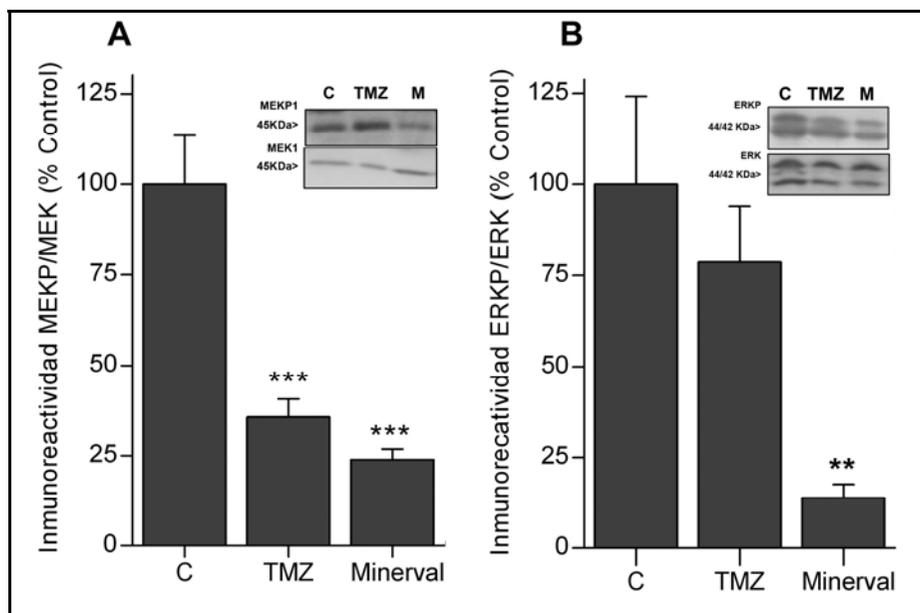


Figura 31. Efecto del tratamiento con Minerval (M) y Temozolomida (TMZ) sobre los niveles de fosforilación de MEK (A) y ERK (B) en xenotrasplantes de glioma humano SF-767. Ratones NUDE Swiss CrI:UN(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (C) cada 24 horas durante 50 días. Cada columna representa la media±EEM de 10 ó 15 muestras, expresado en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). **p<0.01, ***p<0.001.

4.2.11. El Minerval induce diferenciación en tumores derivados de células de glioma humano (SF-767).

Estudios anteriores mostraron el efecto inductor de la diferenciación del Minerval *in vitro*, en células de glioma humano SF-767 (Terés *et al.* Datos no publicados). Para estudiar el posible efecto inductor de la diferenciación celular *in vivo*, se estudiaron los niveles de los marcadores de diferenciación celular Glutamina Sintetasa y GFAP *ex vivo* a partir de tumores de ratones NUDE Swiss CrI:UN(Ico)-Foxn1^{nu}, inoculados subcutáneamente con células de glioma humano SF-767. Las proteínas se detectaron y cuantificaron por técnicas inmunológicas, como se describe en el apartado 2.4.4. de Materiales y métodos.

Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (control) cada 24 horas durante 50 días.

El tratamiento con Minerval incrementó significativamente la inmunoreactividad de la proteína Glutamina Sintetasa 2,5 veces respecto a ratones tratados con Temozolomida (351 ± 23 vs 137 ± 24 , respectivamente) y el triple respecto a ratones control tratados con vehículo (351 ± 23 y 100 ± 11 , respectivamente) (Figura 32). Asimismo, el tratamiento con Minerval incrementó el doble los niveles de la proteína GFAP cuantificada *ex vivo* a partir de tumores de ratones tratados con Minerval, respecto a ratones tratados con Temozolomida y a ratones control (Figura 32). Estos resultados demuestran que el Minerval, pero no la Temozolomida, es capaz de inducir el proceso de diferenciación en xenotrasplantes de células de glioma SF-767.

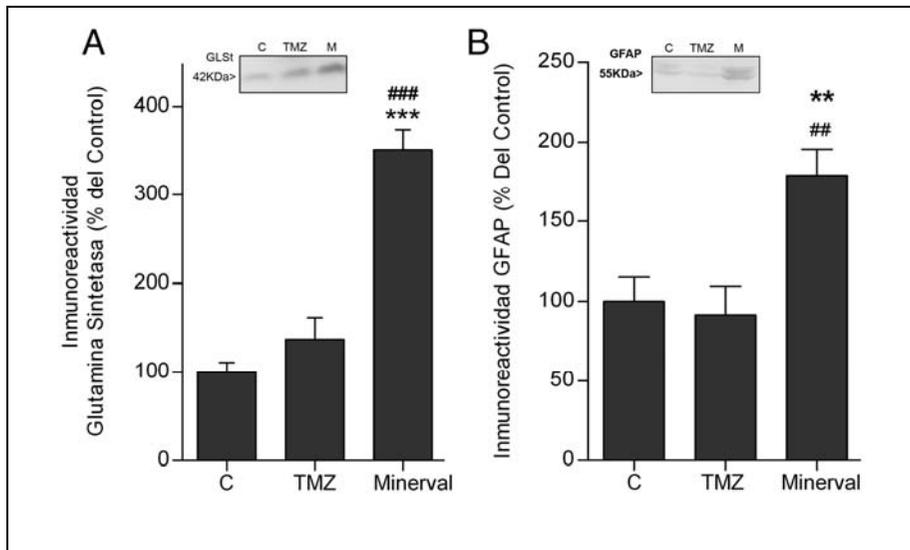


Figura 32. Efecto del tratamiento con Minerval (M) y Temozolomida (TMZ) sobre los niveles de Glutamina Sintetasa y GFAP en xenotrasplantes de glioma humano SF-767. Ratones NUDE Swiss CrI:UN(lco)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (C) cada 24 horas durante 50 días. Cada columna representa la media±EEM de 10 ó 15 muestras, expresado en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). **p<0.01, ***p<0.001.

Finalmente, se detectó el marcador de diferenciación Glutamina Sintetasa *in vivo* mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (Odissey) en ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} tal y como se describe en el apartado 2.2.4. de Materiales y Métodos. Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (Control) cada 24 horas durante 50 días. Se observó una sobreexpresión del marcador de diferenciación Glutamina Sintetasa *in vivo* en tumores de ratones tratados con Minerval (303±12%), pero no en tumores de ratones tratados con Temozolomida o vehículo (Figura 33).

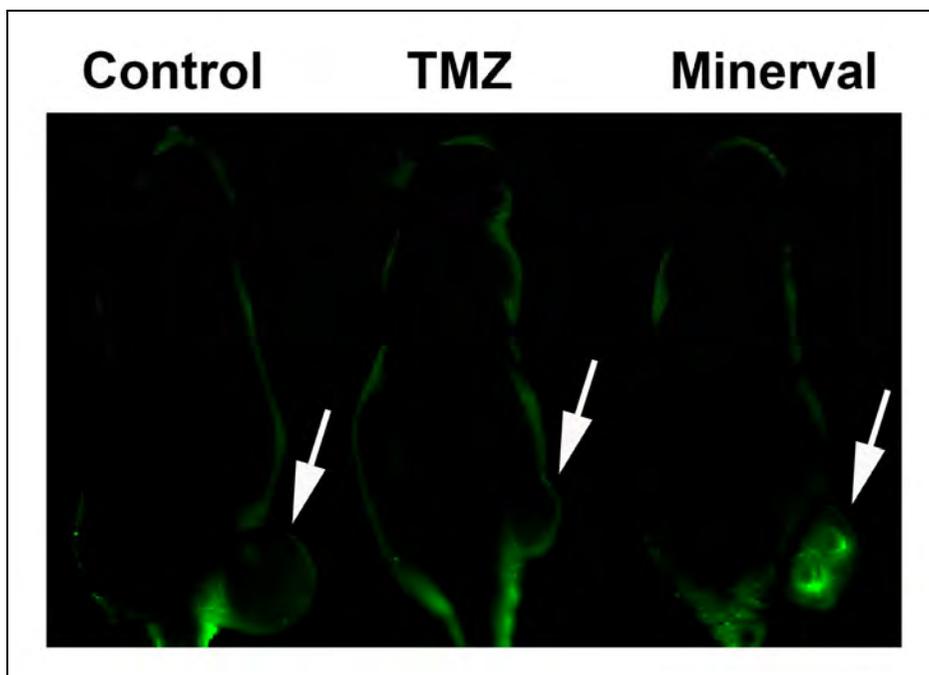


Figura 33. Panel representativo de la detección *in vivo* del marcador de diferenciación Glutamina Sintetasa mediante espectroscopía de infrarrojo cercano en tumores subcutáneos inducidos por células SF-767. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (Control) cada 24 horas durante 50 días.

4.2.12. El Minerval induce autofagia en células de glioma humano (SF-767)

Se trataron células de glioma humano SF-767 con diferentes dosis de Minerval durante 120 horas para su posterior estudio mediante microscopía electrónica, tal y como se describe en el apartado 2.7. de Materiales y Métodos.

Las células tratadas con Minerval durante 120 horas, presentaron alteraciones morfológicas importantes que se pudieron observar en los cortes semifinos (1,5 μm). Mediante microscopía óptica, se observó que las células control (no tratadas con Minerval) presentaban forma ovalada y contenían núcleos con múltiples nucléolos distribuidos a lo largo de la matriz nuclear y algunas invaginaciones. Por el contrario, las células tratadas con 300 μM de Minerval durante 120 horas, mostraron una morfología irregular y un tamaño inferior a las células control. Los núcleos de las células tratadas presentaron menor tamaño y profundas invaginaciones en la membrana (Figura 34).

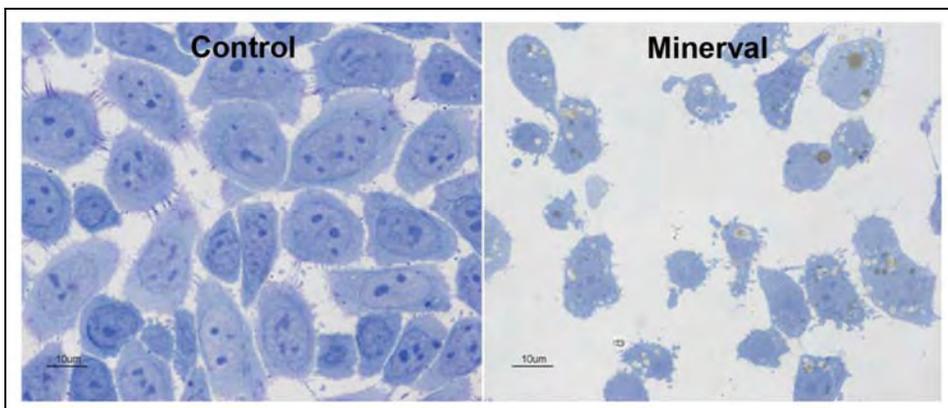


Figura 34. Fotografías representativas de cortes semifinos de células de glioma humano SF-767 tratadas en presencia y ausencia de Minerval durante 120 horas.

Las micrografías realizadas con el microscopio electrónico mostraron numerosas y profundas invaginaciones en de la membrana nuclear de las células tratadas con Minerval durante 120 horas que se hicieron más pronunciadas en función de la concentración de Minerval (marcadas con flechas en la Figura 35-8 y 35-9).

Asimismo las células tratadas con Minerval presentaron un aumento de vesículas lipídicas (*lipid droplets*) diseminadas en el citoplasma así como de vesículas densas con características morfológicas de autofagosomas (Figura 35-7). Las células tratadas con Minerval también mostraron una pérdida de cisternas del retículo endoplásmico comparado con las células control (Marcadas con flechas en la Figura 35-10 y 35-11).

La pérdida de cisternas del retículo endoplasmático y la presencia de autofagosomas observada en células SF-767 tratadas con Minerval, son consistentes con un proceso de autofagia (Figura 35).

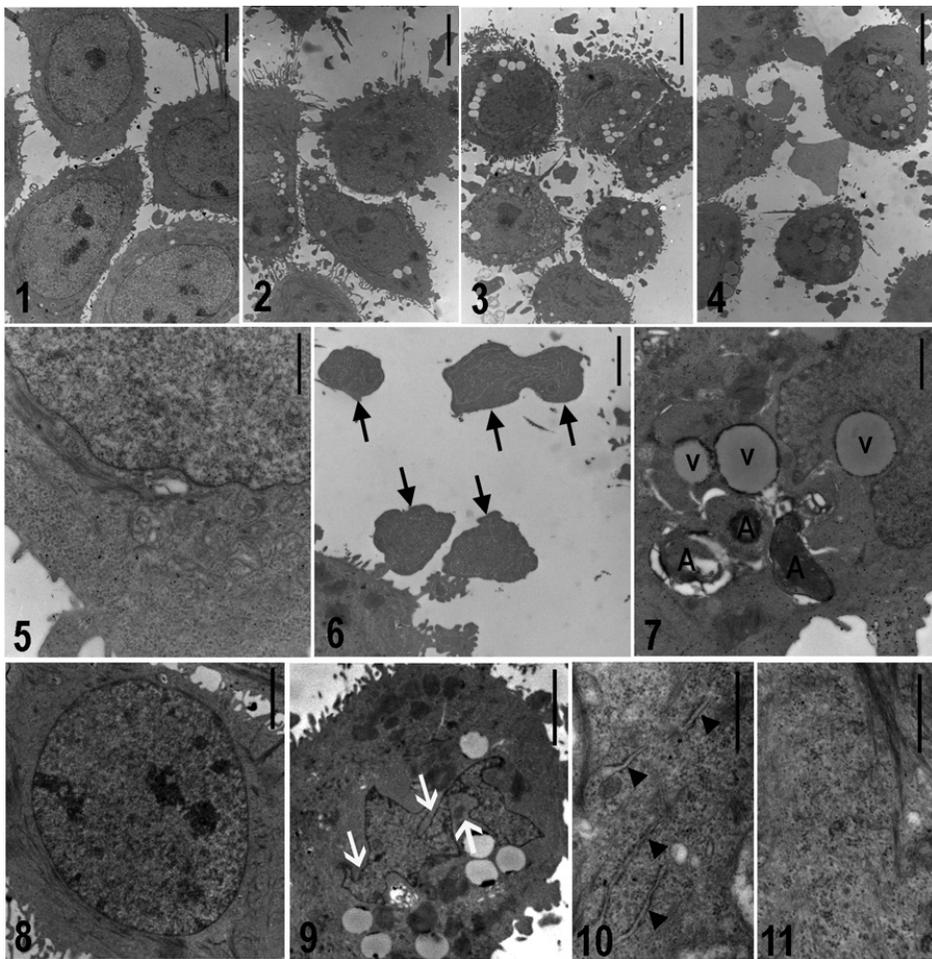


Figura 35. Microscopía electrónica de células de glioma humano SF-767. Las células SF-767 se mantuvieron 120h en ausencia (Control, 1, 5, 8 y 10) o presencia de Minerval (100 μ M: 2, 200 μ M: 3, 6 y 7, 300 μ M: 4, 9 y 11). Las flechas en el panel 6 corresponden a fragmentos de células SF-767. **V:** vesículas lipídicas “lipid droplets”, **A:** autofagosomas. Las flechas en los paneles 8 y 9 corresponden a las invaginaciones en los núcleos de células SF-767 cultivadas en ausencia (8) o presencia de Minerval (9) (bar=2.5 μ m). Las flechas en los paneles 10 y 11 corresponden a la pérdida de cisternas del Retículo Endoplasmático en células tratadas con Minerval (11) (bar=0.5 μ m). N=300.

Se investigaron los mecanismos moleculares implicados en el proceso celular de autofagia. Para ello se determinaron los niveles de varias proteínas implicadas en el proceso de autofagia como los marcadores Atg5 y LC3B, en células de glioma Humano SF-767.

Se observó un incremento de los niveles de los marcadores de autofagia Atg5 y LC3B, en función del tiempo y la dosis de tratamiento con Minerval (150 y 200 μM).

En células SF-767 tratadas con 150 μM Minerval durante 96 horas, se observaron incrementos de aproximadamente el doble en los niveles de Atg5 respecto al control. Este incremento fue aún mayor en células SF-767 tratadas durante 96 horas con 200 μM de Minerval (Figura 36 A).

Además, la ratio de los marcadores LC3BI y LC3BII (LC3BI/II) aumentó el triple en células tratadas con 200 μM de Minerval durante 72 horas respecto a células no tratadas. Las células tratadas con 200 μM de Minerval durante 96 horas, aumentaron la ratio LC3BI/II cuatro veces respecto a las células no tratadas (Figura 36 B).

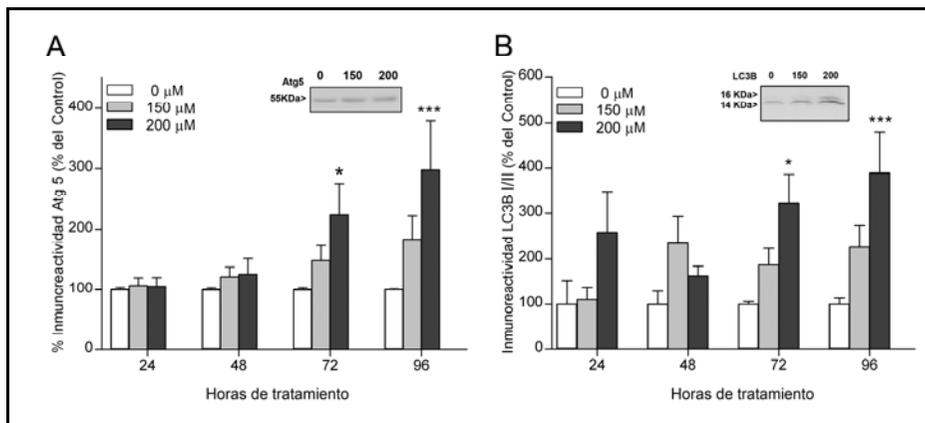


Figura 36. Efecto del tratamiento con Minerval sobre los niveles de los marcadores de autofagia Atg5 y LC3B/II. Las células de glioma humano SF-767 se trataron con 150 y 200 μM de Minerval durante 24, 48, 72 y 96 horas. Cada valor representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a las células no tratadas (tomadas como 100%). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

4.2.13. El Minerval induce autofagia en tumores derivados de células de glioma humano (SF-767)

A continuación se investigaron los mecanismos moleculares implicados en el proceso de autofagia en tumores subcutáneos inducidos con células SF-767 en ratones NUDE Swiss Crl:UN(lco)-Foxn1^{nu}. Para ello se estudiaron los niveles de los marcadores de autofagia: Atg5 y LC3B I/II en dichos tumores. Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) vehículo (Control), cada 24 horas durante 50 días.

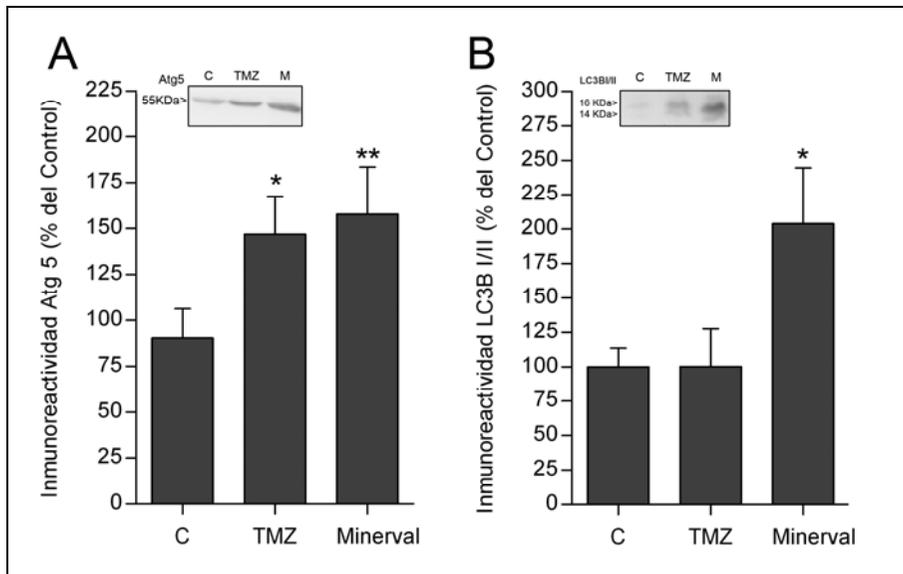


Figura 37. Efecto del tratamiento con Minerval (M) y Temozolomida (TMZ) sobre los niveles de marcadores de Autofagia Atg5 y LC3B I/II en xenotrasplantes de glioma humano SF-767. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(lco)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral Minerval (600 mg/Kg), Temozolomida (80 mg/Kg) y vehículo (C) cada 24 horas durante 50 días. Cada columna representa la media±EEM de 10 ó 15 muestras, expresado en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). *p<0.05, **p<0.01.

Se observó un aumento significativo en los niveles del marcador Atg5 en tumores de ratones tratados con Minerval y Temozolomida respecto a ratones control ($157\pm 25\%$, $146\pm 20\%$ y $100\pm 15\%$, respectivamente) (Figura 37 A). Finalmente, la ratio del marcador de autofagia LC3BI/II aumentó el doble en tumores de ratones tratados con Minerval, mientras que sus niveles no variaron en tumores de ratones tratados con Temozolomida y vehículo (Figura 37 B).

4.3. Efecto del Minerval sobre células de cáncer de pulmón no microcítico (A549)

4.3.1. Efecto del Minerval sobre la progresión de xenotrasplantes de la línea celular A549 en ratones inmunodeprimidos

Se estudió *in vivo* el efecto crónico (50 días) del Minerval y de dos quimioterápicos de referencia en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC): cisplatino, un agente citotóxico alquilante del ADN y Erlotinib, un inhibidor de las tirosina quinasa.

La administración oral de Minerval (600 mg/Kg) en ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn^{1nu}, redujo significativamente el volumen del tumor a partir del día 30 de tratamiento, respecto a los ratones del grupo Control tratados con vehículo (trioleína), Cisplatino (100 mg/Kg i.p.) o Erlotinib (Tarceva[®]) (30mg/Kg) (139±49 mm³, 371±38 mm³, 295±35 mm³, y 218±25 mm³, respectivamente).

Al final del tratamiento (día 50), se observó una reducción significativa del volumen del tumor de un 60% entre el grupo de ratones control y el grupo de ratones a los que se les administró Minerval (1215±137 mm³ y 500±131 mm³, respectivamente). Además, se observó una reducción significativa de un 45% entre el grupo de ratones tratados con Minerval respecto al grupo de ratones tratados con Cisplatino (906±136 mm³) y de un 30% respecto al grupo de ratones tratados con Erlotinib (714±144 mm³). (Figura 38 y Figura 39).



Figura 38. Panel representativo de los xenotrasplantes en ratones NUDE Swiss Cri:NU(lco)-Foxn1^{nu} inoculados con 7,5-10⁶ células A549 después de 50 días de tratamiento. Los ratones recibieron por vía intraperitoneal Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas, y por vía oral Tarceva (30mg/Kg), Minerval (600 mg/Kg) y vehículo (Control) cada 24 horas durante 50 días.

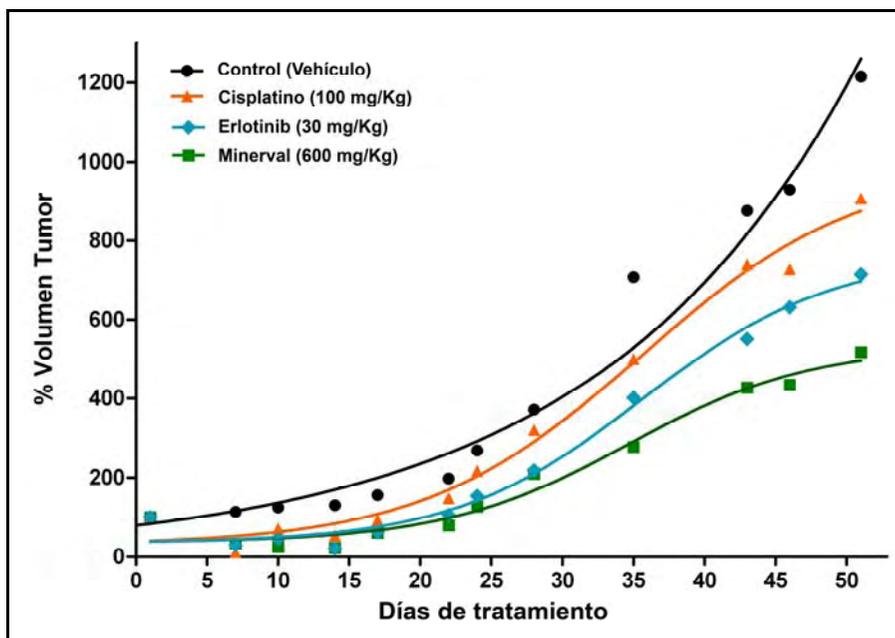


Figura 39. Efecto crónico del tratamiento con Minerval, Erlotinib y Cisplatino sobre la progresión de xenotrasplantes de células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Los ratones NUDE Swiss Cri:NU(lco)-Foxn1^{nu} recibieron por vía intraperitoneal Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas, y por vía oral Tarceva (30mg/Kg), Minerval (600 mg/Kg) y vehículo (Control) cada 24 horas durante 50 días. El volumen del tumor (expresado en mm³) se midió como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Cada valor representa la media de 15 a 20 animales por grupo.

4.3.2. Estudio citohistológico de xenotrasplantes de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

Se analizaron muestras de tejido de tumores de ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu} inoculados subcutáneamente con células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Los cortes histológicos de ratones Control, tratados con vehículo (p.o. trioleína cada 24 horas) presentaron tumores pseudoencapsulados con una amplia zona periférica bien conservada de células viables A549 (Figura 40 A).

Los cortes histológicos de ratones tratados con Minerval (p.o. 600 mg/Kg cada 24 horas), presentaron un tumor con amplias zonas necróticas que representan un 20% del tumor (Figura 40 B).

Los cortes histológicos de ratones tratados con Cisplatino (i.p. 100mg/Kg cada 72 horas) presentaron pequeñas zonas necróticas (Figura 40 B) combinadas con zonas de células viables (Figura 40 A).

En todos los casos se observó un carcinoma de células grandes sin diferenciación glandular (Figura 40).

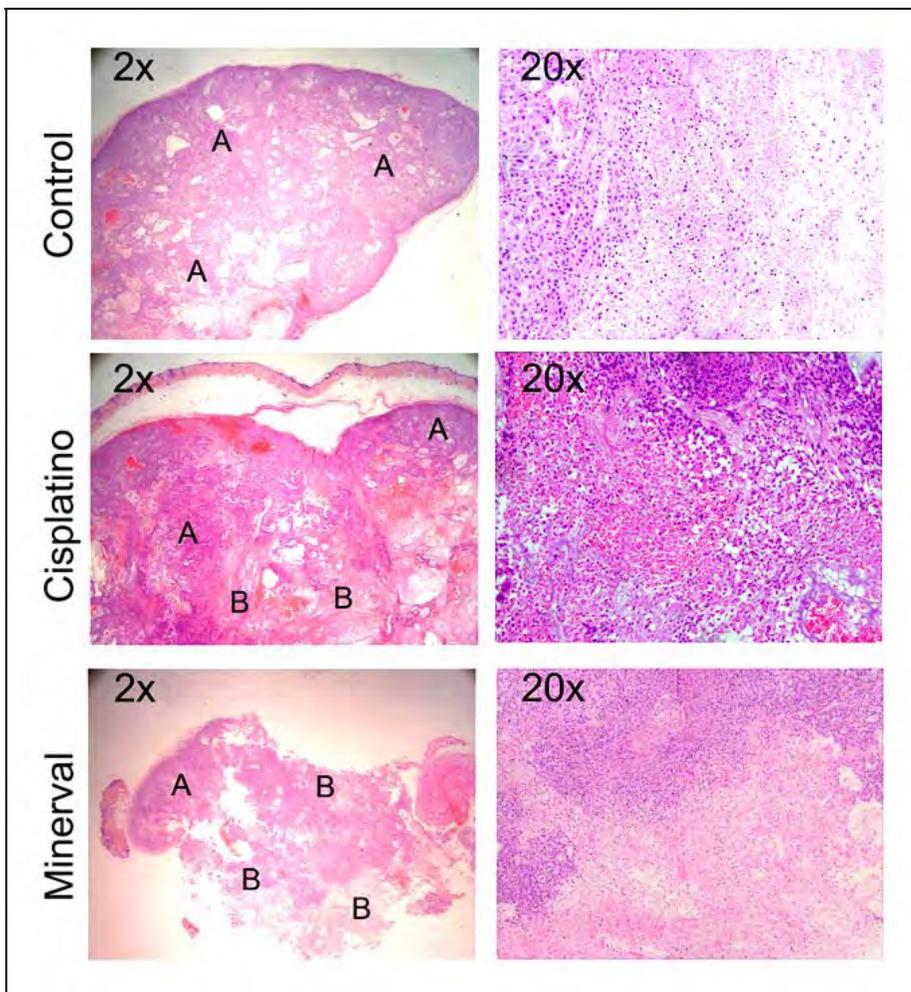


Figura 40. Cortes histológicos representativos de xenotrasplantes de células cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones NUDE Swiss CrI:NU(lco)-Foxn1^{nu} tratados por vía oral cada 24 horas con vehículo (Control), Minerval (600 mg/Kg) y por vía intraperitoneal Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas, durante 50 días. En el panel de la izquierda (2X): Zonas viables (A) y zonas necróticas (B). En el panel de la derecha (20x): detalle de núcleos de células viables y no viables en tumores tratados con vehículo (Control), Cisplatino y Minerval.

4.3.3. Efecto del Minerval sobre la viabilidad celular en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón(MRC5)

Se estudió el efecto sobre la viabilidad celular del Minerval a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 750 y 1000 μM) en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y en fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5, a distintos tiempos de tratamiento (3, 6, 12, y 24 horas) (Figura 42). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio deprivado de suero, suplementado con un 0,1% de BSA.

El Minerval afectó a la viabilidad celular en células A549 de manera dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento. La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) se estableció en una concentración de Minerval de 600 μM a 3, 6 y 12 horas, mientras que a 24 horas de tratamiento la CI_{50} se estableció a una concentración de Minerval de 400 μM (Figura 42).

En la línea no tumoral MRC5 no se llegó a establecer la CI_{50} a ninguna concentración de Minerval a ningún tiempo de tratamiento (Figura 42).

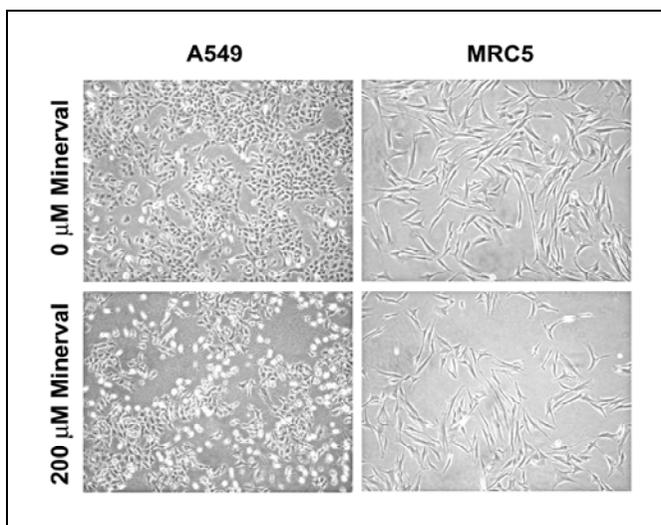


Figura 41. Fotografías representativas de células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5 tratadas en presencia y ausencia de Minerval durante 24 horas.

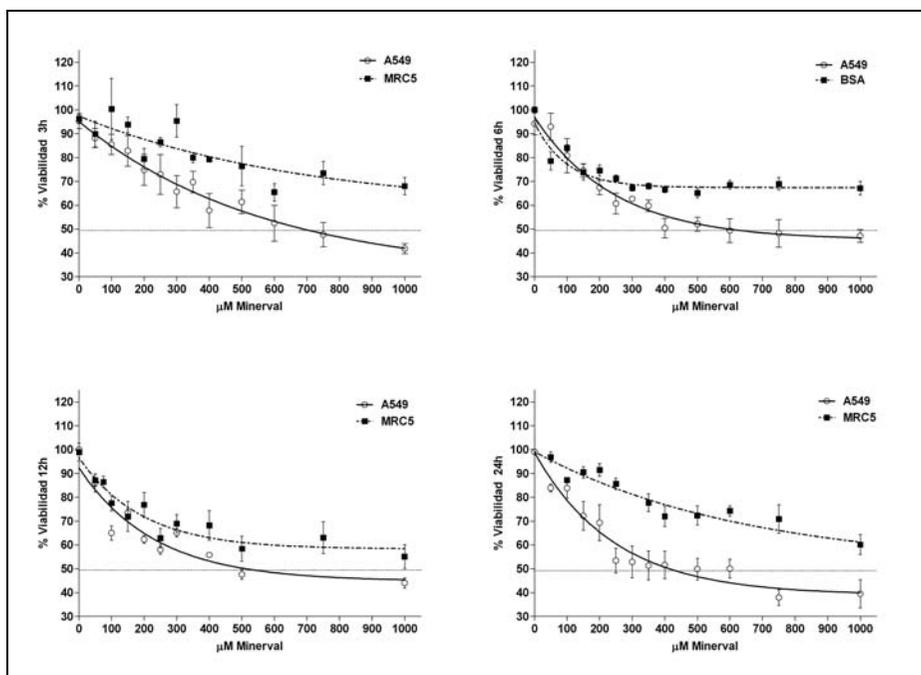


Figura 42. Efecto del Minerval sobre la viabilidad en la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y la línea celular de fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células A549 y MRC5 se cultivaron en medio deprivado de suero y suplementado con 0,1% de BSA. Cada valor representa la media±EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a las células no tratadas (tomadas como 100%).

4.3.4. Efecto del Minerval sobre la Vía EGFR/Akt

Se investigó el efecto del Minerval sobre la vía de transducción de señal EGFR/Akt y los niveles de las proteínas implicadas en su señalización en la línea de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y en la línea de fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5.

Las proteínas se detectaron y cuantificaron por técnicas inmunológicas como se describe en el apartado 2.4.4 de Materiales y Métodos.

4.3.4.1. Detección del estado de fosforilación de EGFR en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se estudiaron los niveles de fosforilación de EGFR en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5 tratados con 150 y 200 μM de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas. Las células A549 y MRC5 se privaron de suero doce horas antes de su tratamiento con Minerval asegurando la especificidad de la señalización. Se preincubaron durante 3, 6, 12 y 24 horas con Minerval y a continuación se incubaron durante 15 minutos con EGF a una concentración de 35 nM.

El tratamiento con Minerval produjo la inhibición de la fosforilación del EGFR en el aminoácido Tyr 1173, el cual activa la proteína. La reducción de la fosforilación fue de aproximadamente un 50% en células A549, tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 3 y 6 horas, respecto a las células no tratadas. Asimismo, células A549 tratadas con 200 μM de Minerval durante 12 y 24 horas, presentaron una reducción significativa de los niveles de fosforilación de EGFR de aproximadamente un 40% respecto a células no tratadas. Por el contrario, el tratamiento de células A549 con 150 μM de Minerval durante 12 y 24 horas, produjo reducciones no significativas de los niveles de fosforilación de EGFR al compararlos con células no tratadas (Figura 43).

Los niveles de fosforilación de EGFR no se alteraron significativamente en células MRC5 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas (Figura 43).

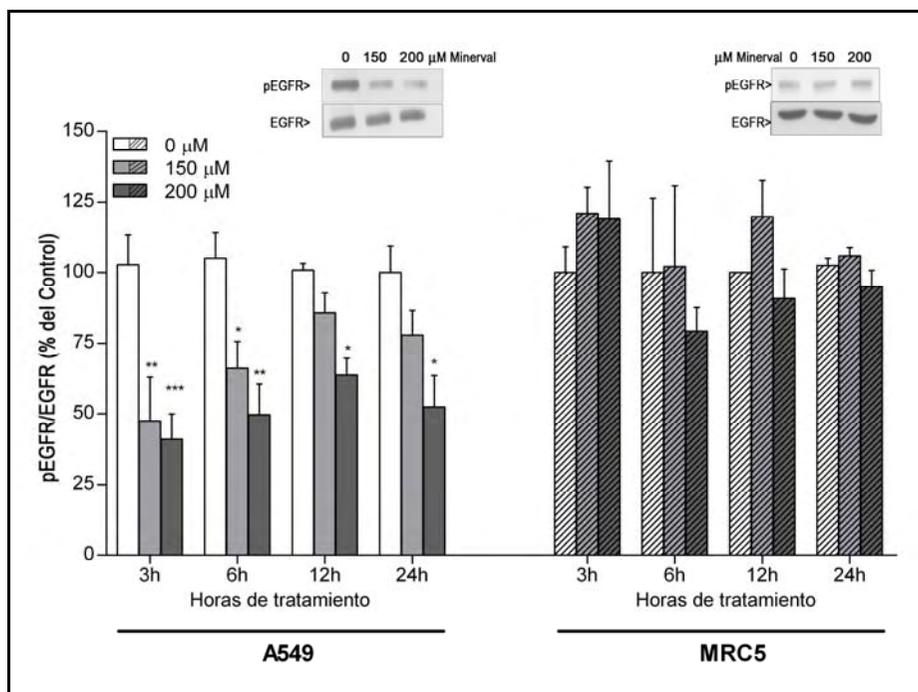


Figura 43. Niveles de fosforilación de EGFR en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron con 150 y 200 μM de Minireval a 3, 6, 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.3.4.2. Detección de EGFR *in vivo* en ratones inmunodeprimidos

Se detectaron los niveles de EGFR *in vivo*, en ratones NUDE Swiss Crl:NU(lco)-Foxn1^{nu} mediante un escáner de infrarrojos, tal y como se describe en el apartado 2.2.4. de Materiales y Métodos. Los ratones tratados con Minireval (600 mg/Kg) cada 24 horas durante 50 días presentaron un 85% menos de unión del ligando EGF a su receptor, respecto a ratones tratados con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas durante 50 días y con vehículo (Control, Figura 44 A y B).

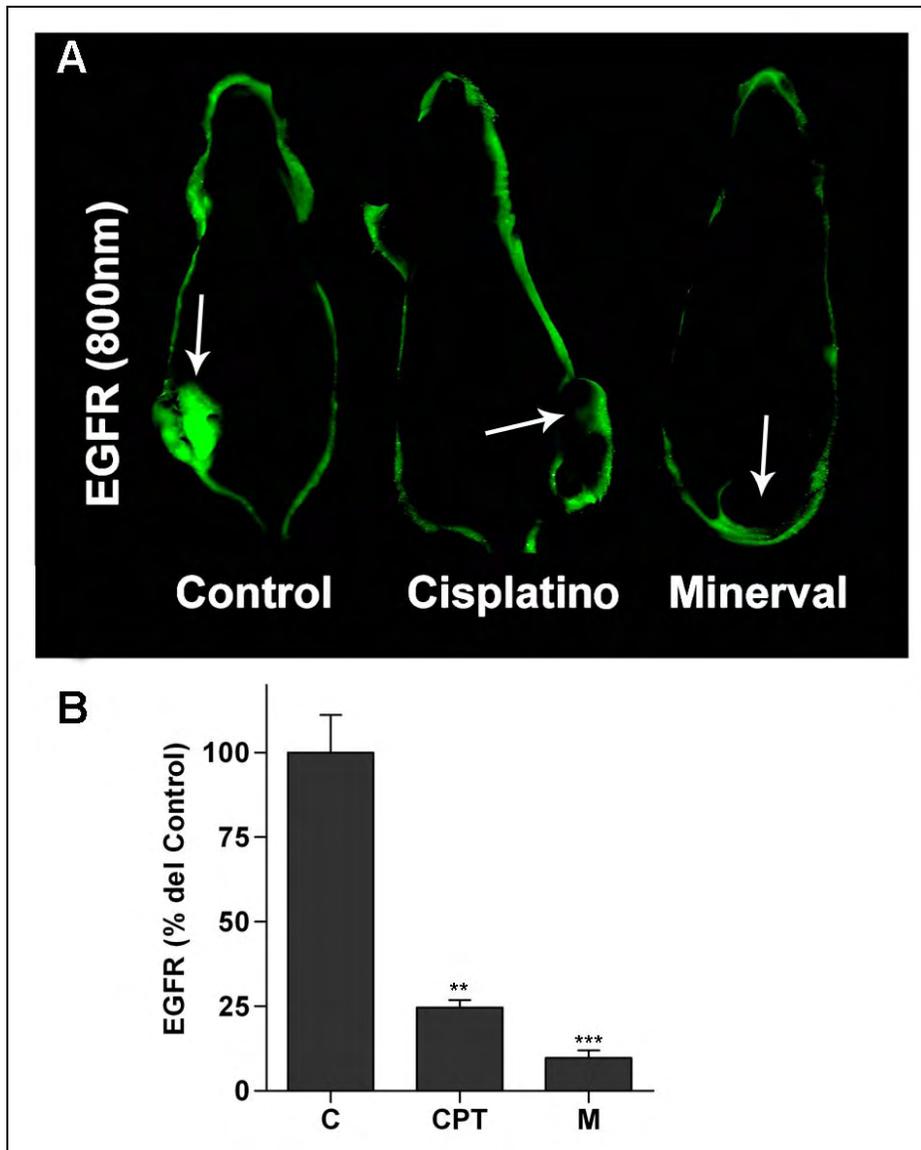


Figura 44. Detección de EGFR. A: Panel representativo de la detección *in vivo* de EGFR en tumores subcutáneos inducidos por células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, mediante escáner de infrarrojos. **B:** Cuantificación de la fluorescencia detectada mediante el escáner de infrarrojos. Cada columna representa la media±EEM de tres experimentos independientes con dos réplicas expresados en porcentaje respecto al control (tomadas como 100%). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En este contexto, se detectaron los niveles de fosforilación de EGFR en cortes histológicos de tumores de ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu}, inoculados subcutáneamente con células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, mediante inmunohistoquímica tal y como se describe en el apartado 2.5.2. de Materiales y Métodos. Se observó un incremento del marcaje de EGFR fosforilado en tumores de ratones tratados con vehículo (Control) respecto a ratones tratados con Minerval (600 mg/Kg) y Cisplatino (100 mg/Kg) durante 50 días (Figura 45).

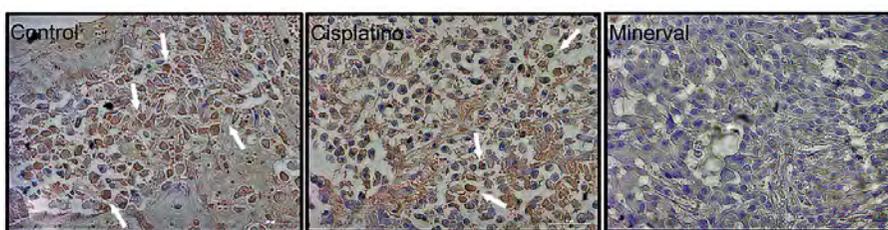


Figura 45. Inmunohistoquímica de EGFR en cortes histológicos de xenotrasplantes inducidos con células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. El marcaje antigénico de fosfo-EGFR se observa en color marrón, los núcleos de las células se observan en color azul. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} recibieron por vía oral Minerval (600 mg/Kg), vehículo (Control), cada 24 horas y por vía intraperitoneal Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas, durante 50 días.

4.3.4.3. Detección del estado de fosforilación de PTEN y PDK1 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se estudiaron los niveles de la fosfatasa PTEN y de la fosforilación activadora de la quinasa PDK1 en su residuo Ser 241, en células A549 y MRC5 tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas. Las células A549 y MRC5 se privaron de suero doce horas antes de su tratamiento con Minerval, asegurando la especificidad de la señalización. Se preincubaron durante 3, 6, 12 y 24 horas con Minerval, a continuación se incubaron durante 15 minutos con EGF a una concentración de 35 nM.

El tratamiento con Minerval produjo un aumento significativo de un 50% en la expresión de PTEN en células A549, tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval durante 12 y 24 horas, respecto a células no tratadas (Figura 46).

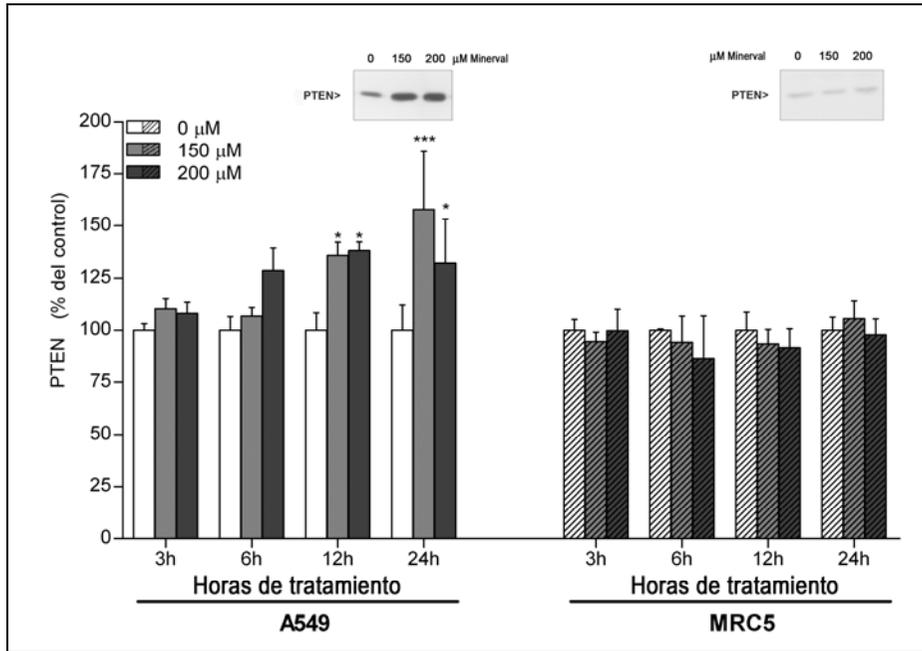


Figura 46. Niveles de PTEN en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron con 150 y 200 μ M de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

El tratamiento con Minerval redujo significativamente en un 50% los niveles de fosforilación de PDK1 en células A549, tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval durante 12 y 24 horas, respecto a células no tratadas (Figura 47).

Por el contrario, los niveles de PTEN y PDK1 no se vieron alterados significativamente en células MRC5 tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas (Figura 46 y 47).

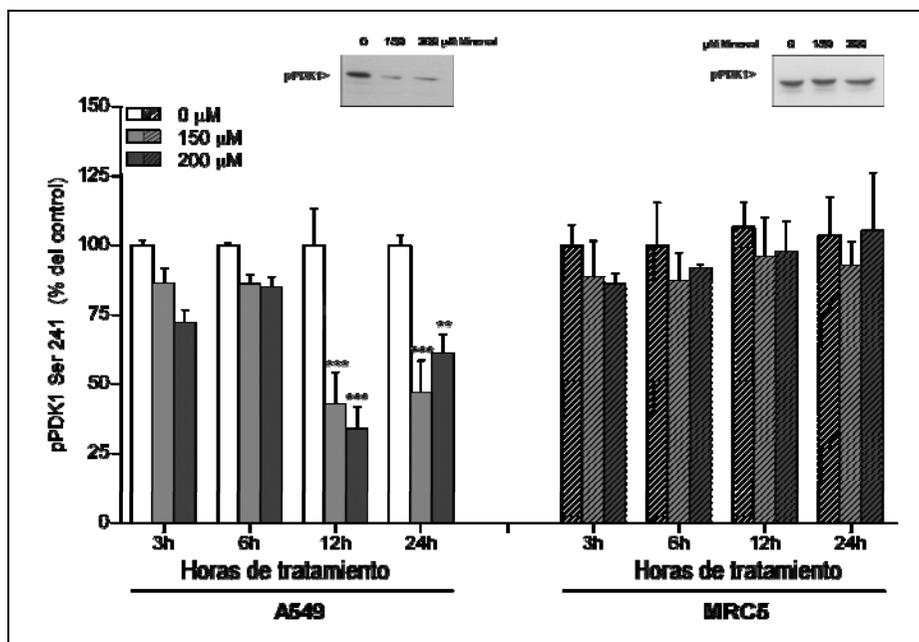


Figura 47. Niveles de pPDK1 Ser 241 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron con 150 y 200 µM de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas. Cada columna representa la media±EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). **p<0.01, ***p<0.001.

4.3.4.4. Detección del estado de fosforilación de PTEN y PDK1 en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

Se estudiaron los niveles de la fosfatasa PTEN y la quinasa PDK1 en tumores subcutáneos inducidos con células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones NUDE Swiss CrI:NU(lco)-Foxn1^{nu}. Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Erlotinib (30 mg/Kg) y vehículo (control) cada 24 horas o por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas durante 50 días.

Los niveles de expresión de PTEN presentaron una tendencia a aumentar en los tumores derivados de células A549 humanas implantadas en ratones desnudos tratados con Minerval y Cisplatino, mientras que los niveles de PTEN no variaron en los tumores de ratones tratados con Erlotinib respecto a

los niveles de los tumores de ratones tratados con vehículo (Control) ($129\pm 12\%$, $123\pm 9\%$, $101\pm 11\%$ y $100\pm 10\%$, respectivamente) (Figura 48 A).

Los niveles de fosforilación de PDK1 disminuyeron significativamente un 60% en tumores de ratones tratados con Minerval respecto a los tumores de ratones tratados con vehículo (control) ($27\pm 8\%$ y $100\pm 20\%$, respectivamente). Por el contrario, los niveles de fosforilación de PDK1 no se alteraron significativamente en tumores de ratones tratados con Cisplatino y Erlotinib ($55\pm 13\%$ y $71\pm 12\%$, respectivamente) (Figura 48 B).

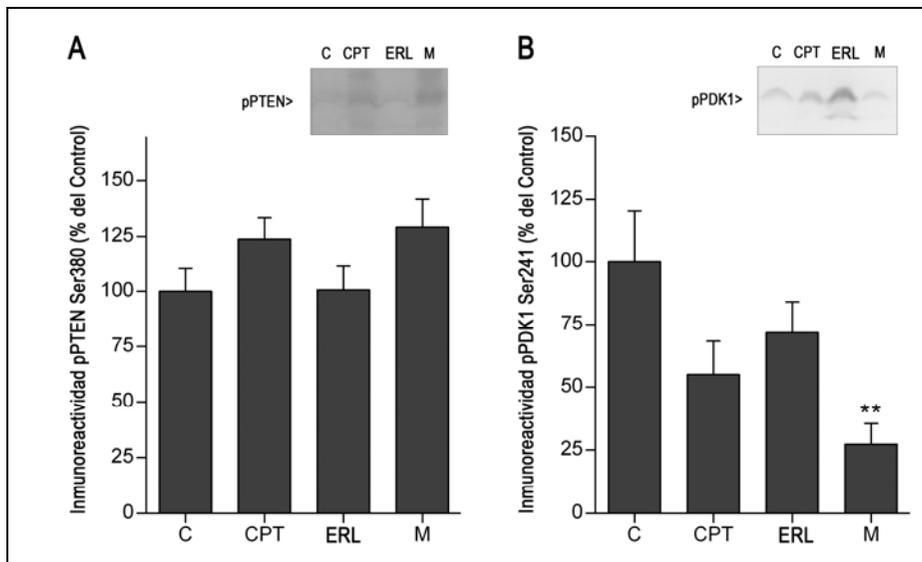


Figura 48. Niveles de PTEN (A) y PDK1 (B) en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Ratones NUDE Swiss CrI:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/ Kg) (M), Erlotinib (30 mg/Kg) (ERL) y vehículo (C) cada 24 horas y por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas (CPT), durante 50 días. Cada columna representa la media \pm EEM de entre 10 ó 15 muestras expresados en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). **p<0.01.

4.3.4.5. Detección del estado de fosforilación de Akt en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se estudiaron los niveles de fosforilación de Akt en sus residuos Thr 308 y Ser 473, cuya fosforilación implica la activación de Akt, en células A549 y MRC5 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas. Las células A549 y MRC5 se privaron de suero doce horas antes de su tratamiento con Minerval, asegurando la especificidad de la señalización. Las células A549 y MRC5, se preincubaron durante 3, 6, 12 y 24 horas con Minerval y a continuación se incubaron durante 15 minutos con EGF a una concentración de 35 nM.

El tratamiento con Minerval produjo la inhibición de la fosforilación de la Thr 308 de Akt en aproximadamente un 40%, en células A549 tratadas con 200 μM de Minerval durante 6 horas, respecto a células no tratadas.

Las células tratadas con 200 μM de Minerval presentaron una reducción significativa de los niveles de fosforilación de la Thr 308 de Akt de aproximadamente un 75% en células tratadas con 200 μM de Minerval durante 12 y 24 horas respecto a células no tratadas (Figura 49).

Los niveles de fosforilación de Akt Thr 308 no se alteraron significativamente en células MRC5 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas (Figura 49).

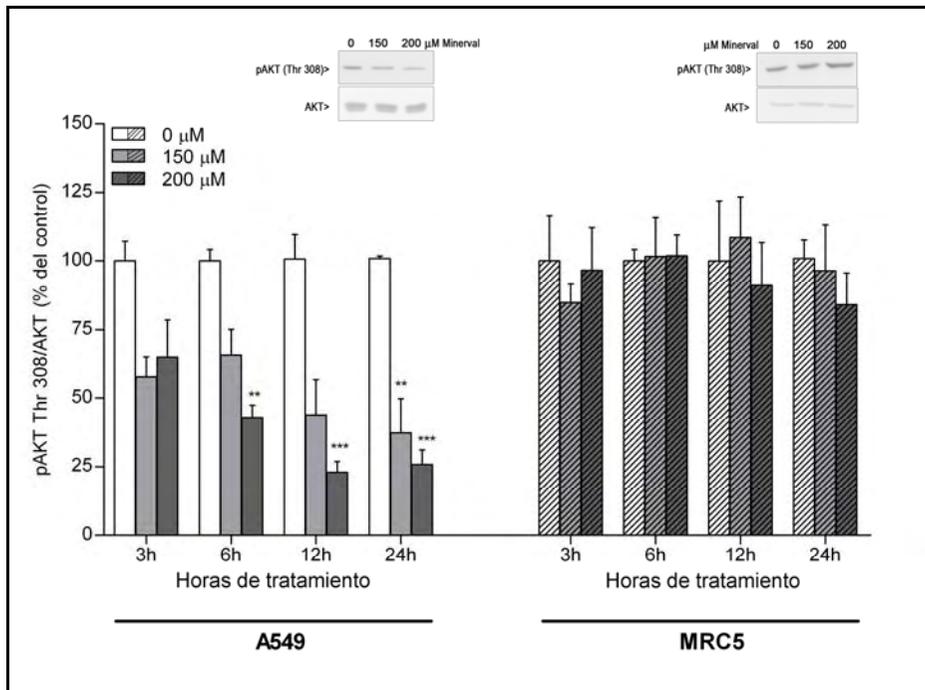


Figura 49. Niveles de fosforilación de Akt Thr 308 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos MRC5. Las células se trataron con 150 y 200 μM de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El tratamiento con Minerval inhibió significativamente la fosforilación de la Ser 473 de Akt en aproximadamente un 50%, en células A549 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas, respecto a células no tratadas (Figura 50).

Por el contrario, en células MRC5 ninguno de los tratamientos alteró significativamente los niveles de fosforilación de la Ser 473 de Akt (Figura 50).

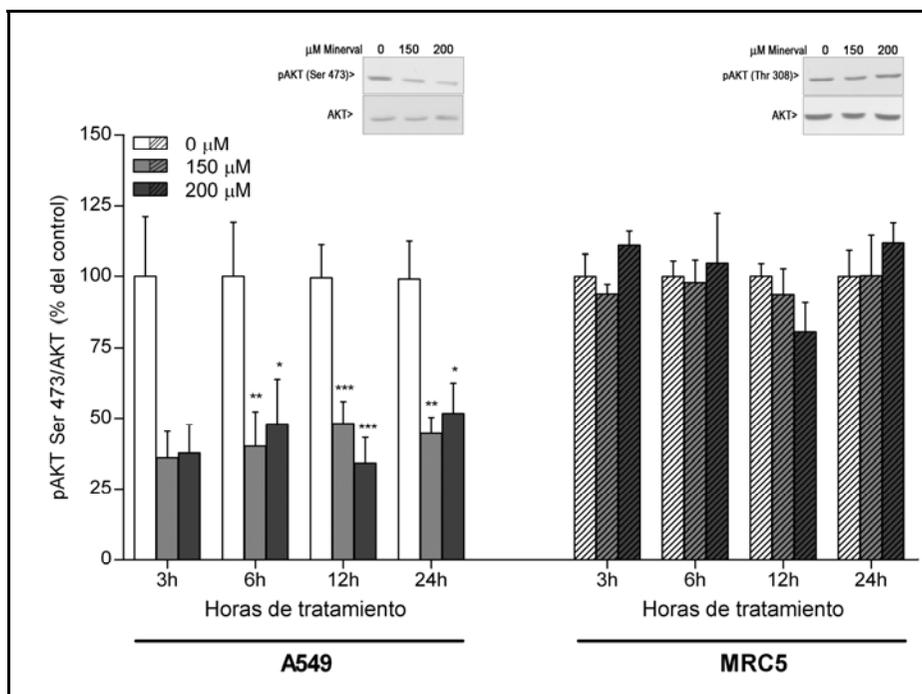


Figura 50. Niveles de fosforilación de Akt Ser 473 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron con 150 y 200 μM de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

4.3.4.6. Detección del estado de la fosforilación de Akt en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

Se estudiaron los niveles de fosforilación de Akt en los residuos Thr 308 y Ser 473 en tumores subcutáneos inducidos con células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones NUDE Swiss CrI:NU(Ico)-Foxn1^{nu}. Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Erlotinib (30 mg/Kg) y vehículo (control) cada 24 horas y por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas durante 50 días. Los niveles de fosforilación de Akt Thr 308 disminuyeron significativamente en un 45% en los tumores derivados de células A549 humanas implantadas en ratones

Resultados

desnudos tratados con Minerval respecto a los tumores de ratones que recibieron vehículo ($53\pm 4\%$ y $100\pm 16\%$, respectivamente). Por el contrario los niveles de fosforilación de Akt Thr 308 no se alteraron significativamente en tumores derivados de células A549 implantadas en ratones desnudos tratados con Cisplatino y Erlotinib ($98\pm 13\%$ y $63\pm 12\%$, respectivamente) (Figura 51 A).

Los niveles de fosforilación de la Ser 473 de Akt disminuyeron significativamente un 70% en tumores de ratones tratados con Minerval respecto a tumores de ratones tratados con vehículo (control) ($31\pm 11\%$ y $100\pm 15\%$, respectivamente). Por el contrario, los niveles de fosforilación de Akt Ser 473 no se alteraron significativamente en tumores de ratones tratados con Cisplatino y Erlotinib ($77\pm 19\%$ y $45\pm 10\%$, respectivamente) (Figura 51 B).

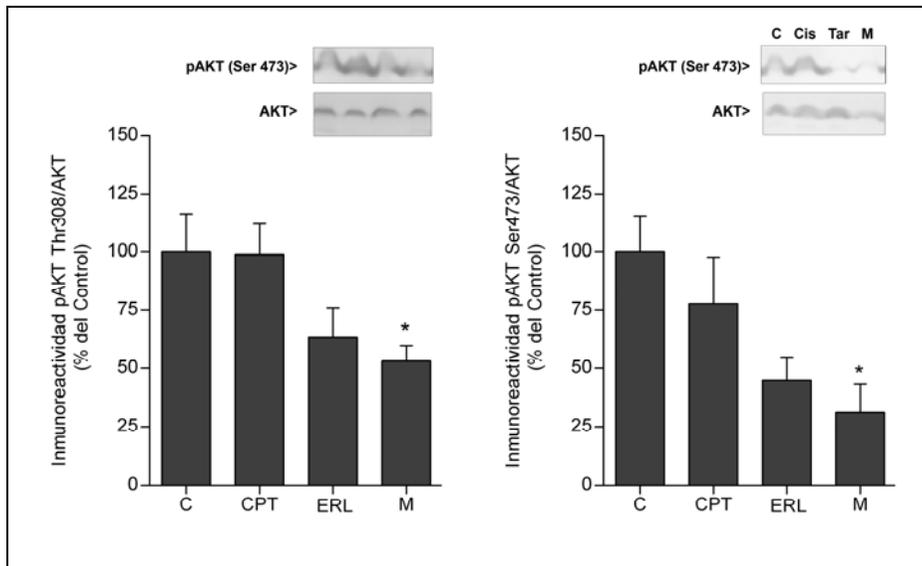


Figura 51. Niveles de fosforilación de Akt Thr 308 (A) y Akt Ser 473 (B) en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/ Kg) (M), Erlotinib (30 mg/Kg) (ERL) y vehículo (C) cada 24 horas y por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas (CPT), durante 50 días. Cada columna representa la media \pm EEM de entre 10 ó 15 muestras expresada en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). * $p < 0.05$.

4.3.5. Efecto del Minerval sobre la vía de las MAPKs en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se investigó el efecto del Minerval sobre la vía de transducción de señal de las MAPKs y sobre los niveles de fosforilación de las proteínas implicadas en su vía de señalización, en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y en fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5.

4.3.5.1. Detección del estado de fosforilación de MEK y ERK en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se estudiaron los niveles de fosforilación de MEK y ERK en células A549 y MRC5 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas. Las células A549 y MRC5 se privaron de suero las doce horas previas al tratamiento y se preincubaron durante 3, 6, 12 y 24 horas con Minerval. A continuación se incubaron durante 15 minutos con EGF a una concentración de 35 nM.

El tratamiento con Minerval produjo una disminución significativa de los niveles de fosforilación de MEK, de aproximadamente un 50% en células A549 tratadas durante 12 y 24 horas con una concentración de 150 y 200 μM de Minerval, respecto a células no tratadas. También se observó una reducción no significativa en los niveles de fosforilación de MEK en células A549 tratadas con una concentración de 150 y 200 μM de Minerval durante 3 y 6 horas, respecto a células no tratadas (Figura 52 A)

Por otro lado, los niveles de fosforilación de ERK disminuyeron significativamente un 40% a 12 horas de tratamiento y un 50% tras 24 horas de tratamiento, en células A549 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval (Figura 52 B).

Por el contrario, en células MRC5, ninguno de los tratamientos alteró significativamente los niveles de fosforilación de MEK y ERK cuando se trataron con concentraciones de 150 y 200 μM de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas (Figura 52 A y B).

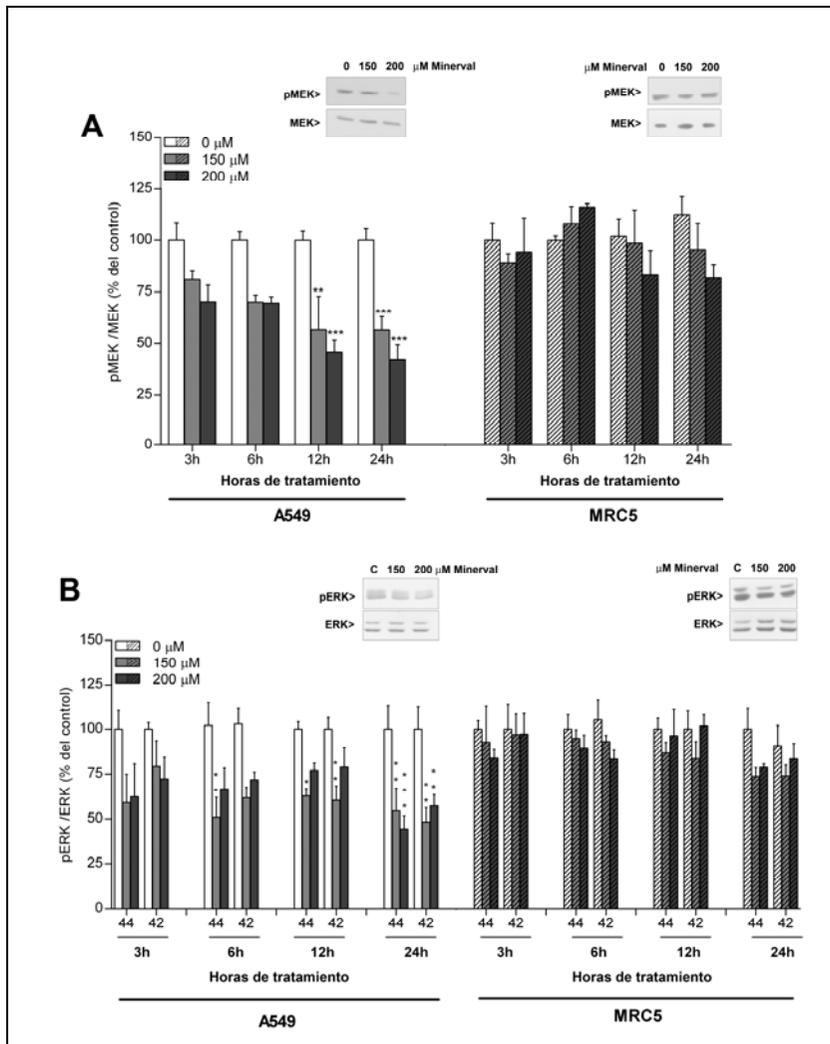


Figura 52. Niveles de fosforilación de MEK y ERK en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron en presencia o ausencia de Minerval a 3, 6, 12 y 24 horas. 44 y 42 indican la fosforilación de las isoformas de ERK 44 y 42 KDa, respectivamente. Cada columna representa la media±EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.3.5.2. Detección del estado de fosforilación de MEK y ERK en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

Se estudiaron los niveles de fosforilación de MEK en tumores subcutáneos inducidos con células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones NUDE Swiss Crl:NU(Ico)-Foxn1^{nu}. Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Erlotinib (30 mg/Kg) y vehículo (control) cada 24 horas o por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas, durante 50 días.

Los niveles de fosforilación de MEK disminuyeron aproximadamente un 50% en los tumores de ratones tratados con Minerval respecto a los tumores de ratones que recibieron vehículo. Por el contrario los niveles de fosforilación de MEK no se alteraron significativamente en tumores tratados con Cisplatino y Erlotinib (Figura 53 A).

Los niveles de fosforilación de ERK disminuyeron significativamente un 50% en tumores de ratones tratados con Minerval respecto a tumores de ratones tratados con vehículo (control) ($52\pm 6\%$ y $100\pm 15\%$, respectivamente). Por el contrario, los niveles de fosforilación de ERK no se alteraron significativamente en tumores de ratones tratados con Cisplatino y Erlotinib (Figura 53 B).

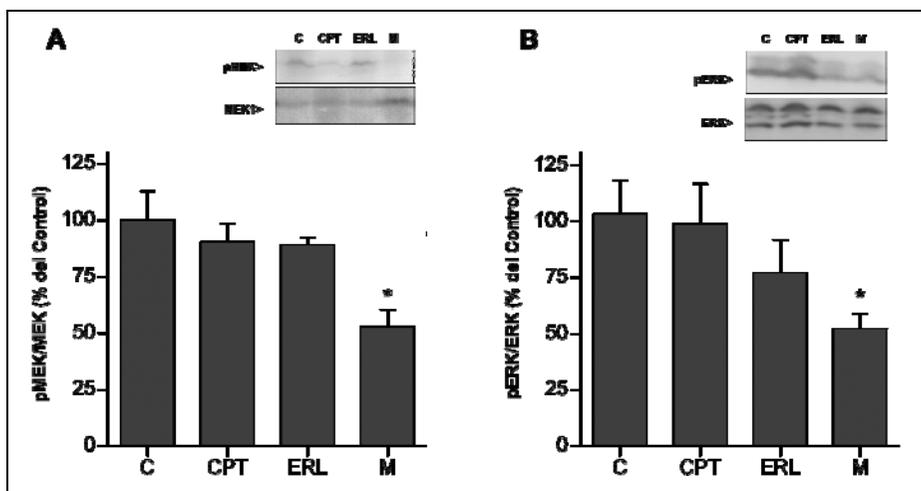


Figura 53. Análisis de los niveles de fosforilación de MEK (A) y ERK (B) en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/ Kg) (M), Erlotinib (30 mg/Kg) (ERL) y vehículo (C) cada 24 horas y por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) (CPT) cada 72 horas, durante 50 días. Cada columna representa la media±EEM de entre 10 ó 15 muestras expresados en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). *p<0.05.

4.3.6. Efecto del Minerval sobre el factor de transcripción FoxO1 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se estudió la traslocación del factor de transcripción FoxO1 en células A549 y MRC5 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval durante 12 y 24 horas. Los núcleos se separaron del citoplasma, tal y como se describe en el apartado 2.4.2 de la sección de Materiales y Métodos.

El tratamiento con Minerval aumentó significativamente la traslocación de FoxO1 del citoplasma al núcleo aproximadamente un 65% y un 50% en células A549, tratadas con 200 μM de Minerval durante 12 y 24 horas respectivamente, respecto a células no tratadas (Figura 54 A).

La traslocación del factor de transcripción FoxO1 del citoplasma al núcleo, en células A549 tratadas con 200 μM Minerval durante 24 horas, también se observó mediante microscopía confocal (Figura 54 B).

Células MRC5 tratadas con 150 y 200 μM de Minerval a 12 y 24 horas no presentaron cambios en la traslocación del factor de transcripción FoxO1 del citoplasma al núcleo (Figura 55 A y B).

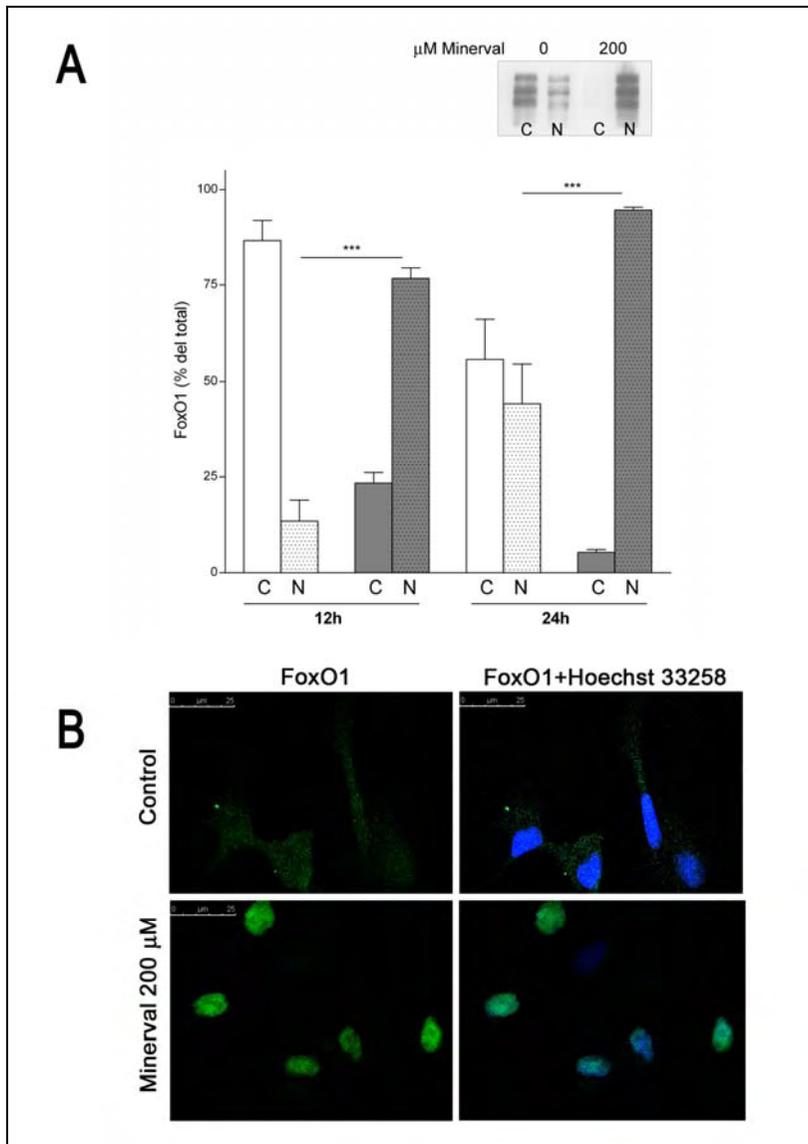


Figura 54. Localización de FoxO1 en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. A: Las células se trataron con 200 μ M de Minerval a 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como 100%). *** p <0.001. **B:** Detección de FoxO1 mediante Microscopía confocal en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Las células se trataron con 200 μ M de Minerval durante 24 horas. El marcaje antigénico de FoxO1 se observa en color verde, los núcleos de las células se observan en color azul.

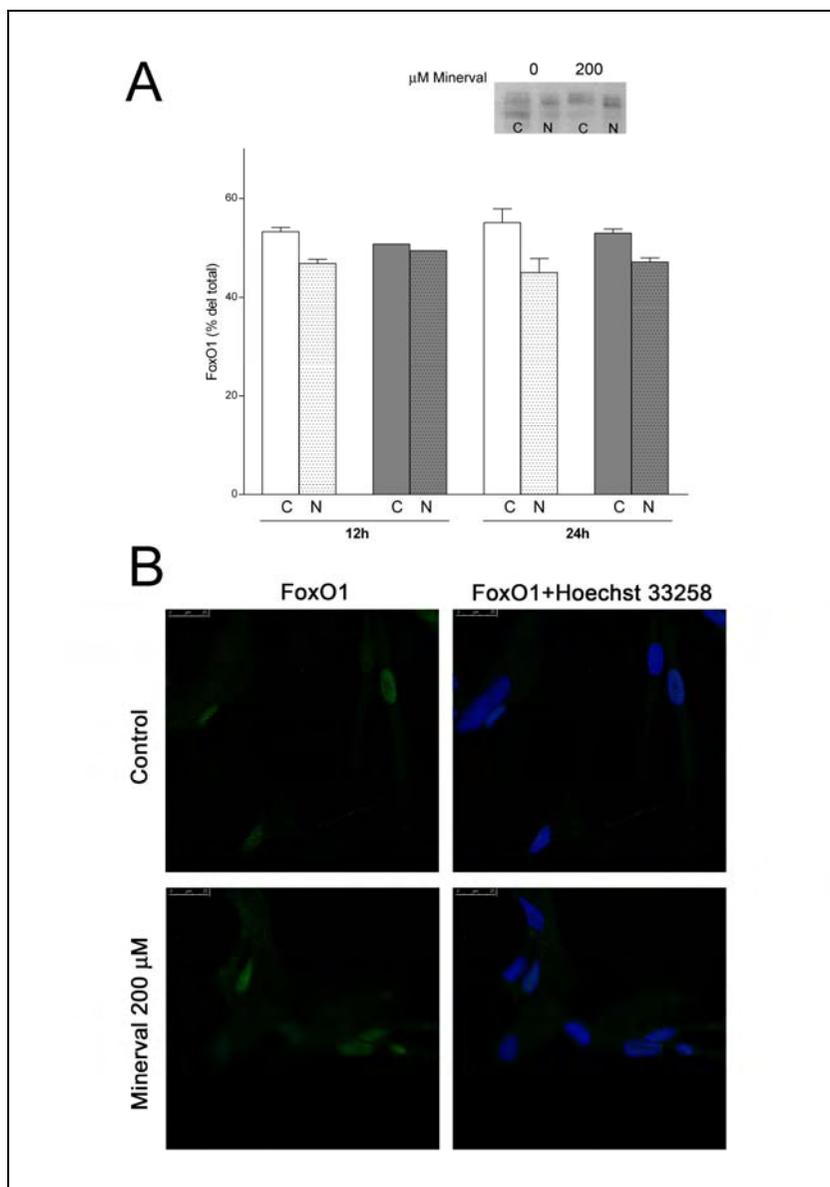


Figura 55. Localización de FoxO1 en fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. **A:** Las células se trataron con 200 μM de Minerval a 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como el 100%). **B:** Detección de FoxO1 mediante Microscopía confocal en fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron con 200 μM de Minerval durante 24 horas. El marcaje antigénico de FoxO1 se observa en color verde, los núcleos de las células se observan en color azul.

4.3.7. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549) y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón (MRC5)

Se analizaron los niveles de expresión de proteínas CKIs reguladoras del ciclo celular, p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, en células de cáncer de pulmón no microcítico A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5.

Se observó un incremento de la expresión de p21^{CIP1} dependiente de la concentración de Minerval y el tiempo de tratamiento en células A549, que fue significativo a las 24 horas de tratamiento con 150 y 200 μ M de Minerval (150 \pm 15% y 144 \pm 16%, respectivamente) respecto a células no tratadas (100 \pm 8%) (Figura 56 A).

En células no tumorales MRC5, ninguno de los tratamientos alteró significativamente los niveles de p21^{CIP1} cuando se trataron con concentraciones de 150 y 200 μ M de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas (Figura 56 A).

Los niveles de la proteína p27^{KIP1}, se incrementaron significativamente en células tratadas con 150 μ M de Minerval durante 12 y 24 horas (143 \pm 9% y 150 \pm 15%, respectivamente) respecto a células no tratadas (100 \pm 8% y 100 \pm 9%, respectivamente). Las células A549 tratadas con 150 y 200 μ M de Minerval durante 3 y 6 horas no incrementaron significativamente los niveles de p27^{KIP1} respecto a células no tratadas (Figura 56 B).

En células MRC5, ninguno de los tratamientos alteró significativamente los niveles de p27^{KIP1} cuando se trataron con concentraciones de 150 y 200 μ M de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas (Figura 56 B).

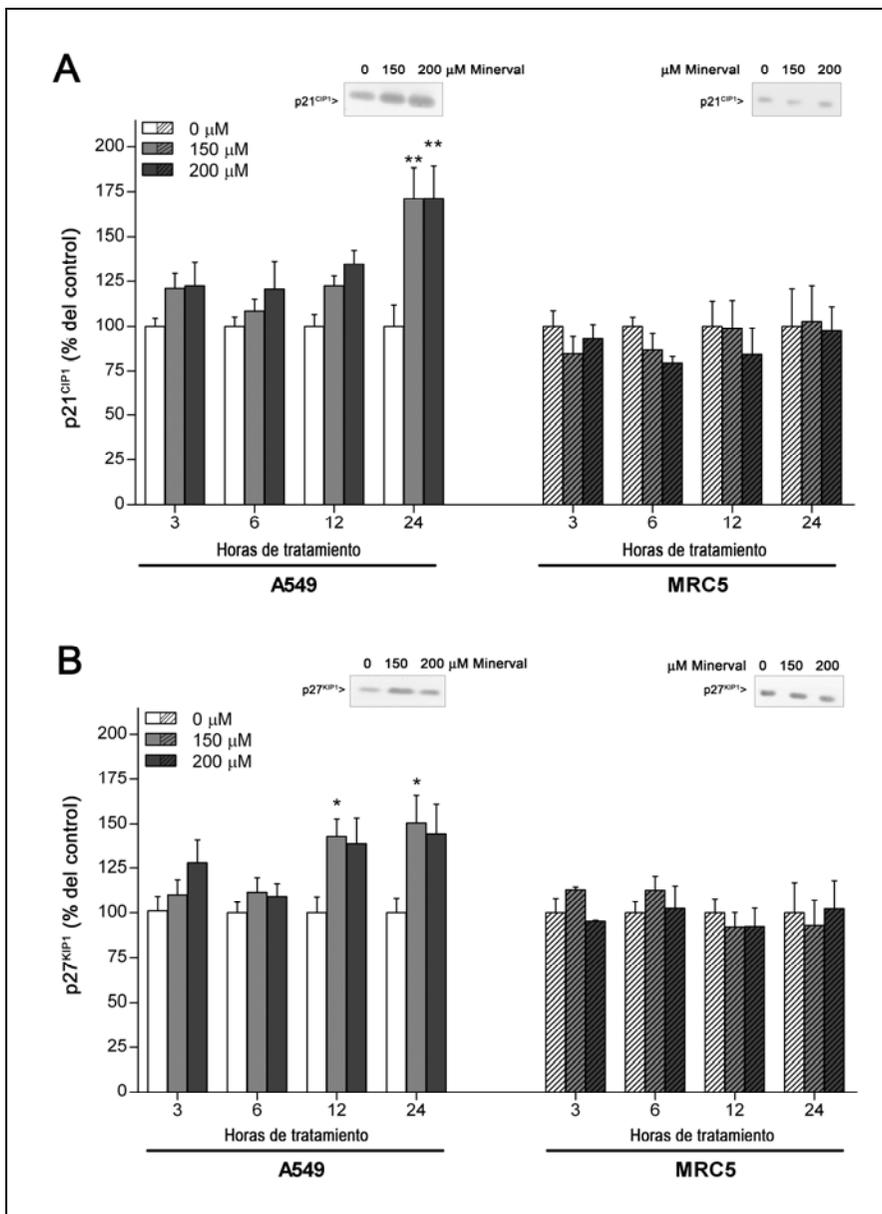


Figura 56. Efecto del tratamiento con Minerval sobre los niveles de CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 y fibroblastos embrionarios humanos de pulmón MRC5. Las células se trataron con 150 y 200 μM de Minerval durante 3, 6, 12 y 24 horas. Cada columna representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes con tres réplicas expresados en porcentaje respecto a células no tratadas (tomadas como el 100%). * $p < 0.05$.

4.3.8. Efecto del Minerval sobre los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en xenotrasplantes de células de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

Se estudiaron los niveles de los CKIs p21^{CIP1} y p27^{KIP1} en tumores derivados de células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones NUDE Swiss CrI:NU(Ico)-Foxn1^{nu}. Los ratones se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/Kg), Erlotinib (30 mg/Kg) y vehículo (control) cada 24 horas o por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) cada 72 horas durante 50 días.

Los tratamientos con Minerval y Erlotinib incrementaron significativamente la expresión de p21^{CIP1} (290±39% y 197±45%, respectivamente) respecto a tumores de ratones tratados con vehículo (control) (100±19%). Por el contrario, los tumores de ratones tratados con Cisplatino no presentaron diferencias significativas en los niveles de p21^{CIP1} (166±34%). (Figura 57 A).

Los niveles de la proteína p27^{KIP1} incrementaron más de tres veces su valor, en tumores de ratones tratados con Minerval (330±36%) al compararlos con los niveles de los ratones tratados con vehículo (100±9%). Los tumores de ratones tratados con Cisplatino y Erlotinib también incrementaron los niveles de p27^{KIP1} significativamente (190±25% y 199±27%, respectivamente) respecto a los niveles de los ratones tratados con vehículo (100±9%) (Figura 57 B).

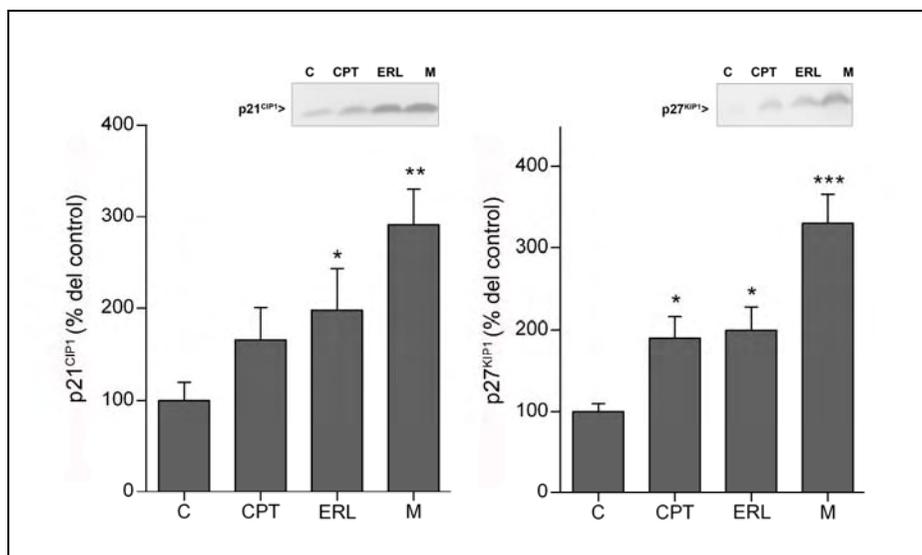


Figura 57. Efecto del tratamiento con Minerval, Cisplatino y Erlotinib sobre los niveles de las proteínas p21^{CIP1} (A) y p27^{KIP1} (B) en xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico humano A549. Ratones NUDE Swiss Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu} se trataron por vía oral con Minerval (600 mg/ Kg) (M), Erlotinib (30 mg/Kg) (ERL) y vehículo (C) cada 24 horas y por vía intraperitoneal con Cisplatino (100 mg/Kg) (CPT) cada 72 horas, durante 50 días. Cada columna representa la media±EEM de entre 10 ó 15 muestras expresadas en porcentaje respecto al control (tomado como 100%). *p<0.05.

4.4. Estudios de toxicidad *in vivo* e *in vitro*

Para comprobar el posible efecto tóxico del Minerval, se llevaron a cabo los siguientes test regulatorios de seguridad farmacológica *in vivo*: test de Irwin, función respiratoria, seguridad cardiovascular, toxicidad oral aguda, dosis máxima tolerada, test NOAEL de toxicocinética y seguridad farmacológica y determinación tóxica (Tabla 6).

Los estudios *in vivo*, llevados a cabo en modelos animales de ratón CD-1, ratas Wistar y perros Beagle no presentaron ningún efecto tóxico relevante después de la administración de Minerval de diferentes lotes a ninguna de las dosis estudiadas.

Tabla 6. Estudios de seguridad farmacológica preclínica *in vivo* (Administración oral)

Estudio	Especie y cepa	Grupo, dosis y Nº de lote	Dosis/ Duración	Resultados
Test de Irwin	Ratón CD-1	Vehículo, 100, 300, 1000 mg/Kg Minerval. Lote 2-OH181A(Na)10	Dosis única	No se observaron efectos en los grupos control ni tratados. No se observó mortalidad en ningún grupo
Función respiratoria	Ratas Wistar	Vehículo, 40, 245, 1500 mg/Kg Minerval	Dosis única	NOAEL al menos 245 mg/kg
Seguridad cardiovascular	Perros Beagle	Vehículo, 20, 200, 600, 900, 1200 mg/kg/día Lote: G2-OHOA-12	14 días	NOAEL más de 200 mg/kg/día y menos de 600 mg/kg/día
Seguridad cardiovascular	Perros Beagle	Vehículo, 100, 400, 1000 mg/kg/día Lote: G2-OHOA-13	28 días con fase de recuperación	NOAEL: 400 mg/Kg/día
Toxicidad oral aguda	Ratas wistar	3000 mg/Kg Lote: 2-OH18A(Na)-10	Dosis única	No se observó mortalidad. MLD>3000 mg/kg. MND: no determinada
Toxicidad oral aguda	Ratón CD-1	3000 mg/Kg Lote: 2-OH18A(Na)-10	Dosis única	No se observó mortalidad. MLD>3000 mg/kg.

MND: no determinada				
Dosis máxima tolerada	Perros Beagle	(1) vehículo, 60, 150, 300, 600, 900 y 1500. (2) 1200 mg/kg Lotes: G2-OHOA-10, G22OHOA-11	14 días	No se observó mortalidad a ninguna dosis. La dosis apropiada para estudios de más de 4 semanas debe ser menor que 1200 mg/kg/día
NOAEL, toxicocinética y seguridad farmacológica	Perros Beagle	Vehículo, 20, 200, 600, 900 y 1200 mg/kg/día. Lote: G2-OHOA-12	14 días	Ligera miocarditis, necrosis miocárdica y pericarditis. NOAEL entre 200 y 600 mg/kg/día
Determinación tóxica	Ratas Wistar	Vehículo, 60, 350, 2000 mg/kg/día. Lote: G2-OHOA-10	14 días	Se considera apropiada una dosis máxima de 1500 mg/kg/día
NOAEL, toxicocinética y seguridad farmacológica	Ratas Wistar	Vehículo, 40, 245 y 1500 mg/Kg/día Lote: G2-OHOA-13	4 semanas	Disminución reversible de esperma en machos al final del tratamiento. NOAEL se definió como 40 mg/Kg/día
Determinación tóxica	Perros Beagle	Vehículo, 100, 400 y 1000 mg/kg/día. Lote: G2-OHOA-13	4 semanas	NOAEL se definió como 400 mg/kg/día

Estudios preclínicos de seguridad farmacológica *in vivo*: Test de Irwin, función respiratoria, seguridad cardiovascular, toxicidad oral aguda, dosis máxima tolerada, NOAEL toxicocinética y seguridad farmacológica y determinación tóxica.

Los estudios regulatorios se completaron con los siguientes test *in vitro* de seguridad farmacológica: test de mutación reversa bacteriana, test de aberración cromosómica, Test de micronúcleos en médula ósea de ratón, Test HERG de seguridad farmacológica (Tabla 7).

Los estudios *in vitro* llevados a cabo en cultivos celulares eucariotas y bacterianos no revelaron ningún efecto tóxico del Minerval a ninguna de las dosis estudiadas (Tabla 7).

Tabla 7. Estudios de seguridad farmacológica preclínica *in vitro*

Estudio	Especie y línea celular	Grupo, dosis y Nº de lote	Resultados
Test de mutación reversa bacteriana	<i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Escherichia Coli</i>	5000, 1666.67, 555.56, 185.19, 61.73 µg/placa. Lote: 2-OH181A(Na)-10	No se observó respuesta mutagénica en ninguna cepa con y sin sistema de activación metabólica
Test de aberración cromosómica	Linfocitos humanos	4.9, 8.5, 14.9, 26.1, 45.7, 80.0, 139.9, 244.9, 428.6, 750 ug/ml. Lote: 2-OH181A(Na)-10	No se observaron aberraciones cromosómicas estructurales
Test de micronúcleos en médula ósea de ratón		0, 125, 500, 2000 mg/kg. Lote: G2-OHOA-12 Control: 20 mg/kg ciclofosfamida	No se observó inducción de micronúcleos
Seguridad farmacológica HERG	Células HEK293	Lote: G2-OHOA-12	Las células HEK293 transfectadas con cDNA HERG, no mostraron inhibición de hERG hasta llegar a la concentración 0.42 µM

Estudios preclínicos de seguridad farmacológica *in vitro*: test de mutación reversa bacteriana, test de aberración cromosómica, Test de micronúcleos en médula ósea de ratón, Test HERG de seguridad farmacológica

5. DISCUSIÓN

5.1. Eficacia del Minerval *in vivo*

5.1.1. Eficacia del Minerval en un modelo de xenotrasplante de glioma humano (SF-767)

Los tumores con un fenotipo indiferenciado como el glioma, tienen una pobre prognosis y actualmente las opciones de tratamiento son muy limitadas. Los tumores primarios cerebrales, entre los cuales el glioma es el más común, presentan una mortalidad muy elevada (90%) (Brenner *et al.*, 2009). Actualmente la cirugía y la radioterapia son la aproximación terapéutica más efectiva para tratar este tipo de tumores, ya que la media de supervivencia de los pacientes que los padecen es de un año (Isaacson, 2000; START, 2006)

El más agresivo de los gliomas existentes es el glioblastoma multiforme, actualmente incurable debido a su rápida proliferación y a su elevada capacidad invasiva (Louis, 2006). El tratamiento con quimioterapia en este tipo de patologías produce ínfimos beneficios frente a los riesgos terapéuticos que conlleva y por lo tanto, urge el diseño de nuevas estrategias innovadoras para el tratamiento del glioma. Actualmente el fármaco de elección es la temozolomida (Temodal), un agente alquilante del ADN que induce inicialmente la regresión del tumor (Athanasios *et al.*, 2005; Bredel, 2001), aunque presenta importantes efectos secundarios, entre ellos, una mielosupresión reversible y trombocitopenia (Armstrong *et al.*, 2005; Doyle *et al.*, 2005; Mutter y Stupp, 2006).

Debido a la carencia de alternativas terapéuticas en el tratamiento de esta enfermedad, un objetivo importante de este trabajo de investigación fue el estudio de la eficacia del Minerval *in vivo* en modelos de xenotrasplantes de glioma humano SF-767. En conjunto, los resultados presentados en esta tesis doctoral, demuestran una elevada eficacia del Minerval en modelos de xenotrasplantes de glioma humano. El volumen del tumor de ratones desnudos tratados con Minerval se redujo en un 80%, presentando una mayor eficacia que el fármaco de referencia en el tratamiento del glioma, la temozolomida. Asimismo, el Minerval presentó una elevada eficacia en un modelo ortópico de glioma de ratones desnudos, reduciendo significativamente el tumor cerebral. Este trabajo indica la capacidad del Minerval de traspasar la barrera hematoencefálica.

Otro aspecto importante en el tratamiento del glioma, es la recidiva que presentan los pacientes después del tratamiento con Temozolomida (Stupp *et al.*, 2005). El tratamiento con Temozolomida incrementa la esperanza de vida en estos pacientes aproximadamente 2,5 meses, lo cual supone un aumento en la supervivencia de 12,1 a 14,6 meses (Stupp *et al.*, 2005). En el presente trabajo de investigación, demostramos ausencia de recidiva en ratones que no presentaban progresión de los tumores después del tratamiento con Minerval y que dejaron de ser tratados. Sin embargo, ratones que no presentaban progresión de los tumores después de su tratamiento con Temozolomida mostraron una rápida y exponencial recidiva cuando dejaron de ser tratados por el quimioterápico en cuestión. La problemática de la recidiva observada en pacientes tratados con Temozolomida puede deberse entre otras causas, muy posiblemente a fenómenos de resistencia frente al tratamiento con agentes alquilantes, como por ejemplo la sobreexpresión de la enzima ADN-O⁶-metilguanina metiltransferasa (MGMT) que repara la fragmentación del ADN provocada por la temozolomida (Citron *et al.*, 1994; Kokkinakis *et al.*, 1997). La resistencia a agentes alquilantes también puede ser debida a que los agentes quimioterápicos que afectan a al ADN no suelen dañar a las células tumorales quiescentes, que pueden retomar su capacidad replicativa después del tratamiento (Chauffert *et al.*, 1998).

Finalmente realizamos estudios de sinergia farmacológica, combinando el Minerval y la temozolomida en el tratamiento del glioma humano SF-767 en ratones desnudos. Comprobamos que esta terapia combinada presentó una eficacia de aproximadamente el 90% en la reducción del volumen del tumor.

En conjunto estos resultados sugieren en primer lugar, que el Minerval es más eficaz y potente que la Temozolomida y podría constituir una terapia de primera línea. Además, el Minerval funciona de forma muy eficaz en terapia combinada con la Temozolomida, por lo que podría ser una estrategia terapéutica que permitiría disminuir las dosis de los quimioterápicos como la Temozolomida, evitando así su alta toxicidad.

5.1.2. Eficacia del Minerval en un modelo de xenotrasplante de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte en el mundo desarrollado, provocando más de un millón de muertes al año (MacKinnon *et al.*, 2010). Las terapias actuales incluyen como tratamiento: la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, por sí solas o en combinación (Mok *et al.*, 2009). Desafortunadamente, las terapias actuales no mejoran el pronóstico de la enfermedad, siendo la tasa de supervivencia después de cinco años de un 15% en este tipo de cáncer (Jemal *et al.*, 2006). Una de las causas de la alta mortalidad es la falta de marcadores para el diagnóstico temprano, aunque se están desarrollando en los últimos años (Bach *et al.*, 2003; Belinsky *et al.*, 2006; Henschke *et al.*, 2006). Asimismo, el arsenal terapéutico existente necesita fármacos más efectivos en el tratamiento de los distintos tipos de cáncer de pulmón existentes. La terapia con fármacos citotóxicos actualmente supone un beneficio/riesgo muy reducido con bajos niveles de eficacia (Group, 1995). Diferentes estudios moleculares de distintos tumores de pulmón, muestran que cada uno de ellos contiene más de 20 alteraciones genéticas o epigenéticas (Sekido *et al.*, 2003), lo cual dificulta la acción de los fármacos antineoplásicos frente a dianas concretas.

El trabajo de investigación llevado a cabo por Lladó *et al.* (2009), muestra la eficacia del Minerval *in vitro* en células de cáncer de pulmón no microcítico A549. En este estudio se demostró que el tratamiento de dichas células con Minerval inhibía su proliferación celular. En la presente tesis, se ha estudiado la eficacia del Minerval *in vivo* en modelos de xenotrasplante de cáncer de pulmón no microcítico humano. En este trabajo de investigación, se ha observado que los tumores inoculados subcutáneamente a ratones desnudos, presentan una reducción del volumen del tumor de un 60%. En este sentido, el Minerva ha demostrado una mayor eficacia en la reducción del tumor respecto a quimioterápicos utilizados actualmente en esta patología, como el Cisplatino y el Erlotinib (Tarceva).

Por ello los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, sugieren que el Minerval podría ser un fármaco eficaz para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico.

5.2. Efecto del Minerval sobre la vía EGFR/RAS

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor tirosín quinasa que induce la proliferación celular. Su alteración contribuye a la resistencia observada en tratamientos con quimioterapia y radioterapia y es una de las oncoproteínas más utilizadas como diana terapéutica para el diseño de fármacos antitumorales (MacKinnon *et al.*, 2010).

Como ya se ha reseñado en la introducción, la activación de EGFR está ligada a la activación de las vías de señalización celular MAPK y PI3K/Akt (Lui y Grandis, 2002), promoviendo la actividad y expresión de proteínas promotoras del ciclo celular como ciclinas y CDKs (Chuang y Ng, 1994; Diehl *et al.*, 1998; Sherr, 1994; Treisman, 1996), además de bloquear los inhibidores del ciclo celular de la familia CIP/KIP (Maddika *et al.*, 2007). Estas evidencias postulan EGFR como una diana terapéutica muy prometedora en la cual se han focalizado numerosos estudios en los últimos años (Huang *et al.*, 2009; Nyati *et al.*, 2006).

Un método terapéutico utilizado actualmente en la inhibición de EGFR, se basa en el uso de anticuerpos monoclonales como cetuximab y panitumumab, los cuales se unen al dominio extracelular del EGFR. El mecanismo de acción de estos anticuerpos monoclonales incluye: disminución de la unión de los ligandos a EGFR, inducción de la internalización de EGFR y citotoxicidad mediada por los propios anticuerpos monoclonales (Goldstein *et al.*, 1995). Estudios preclínicos han demostrado una elevada eficacia en la sinergia de estos anticuerpos monoclonales con quimioterapia y/o radioterapia en la inhibición del crecimiento en modelos de xenotrasplante de cáncer de pulmón no microcítico en ratones desnudos (Steiner *et al.*, 2007).

En este contexto, una nueva aproximación terapéutica es la utilización de inhibidores tirosín quinasa, como el erlotinib y el gefitinib, los cuales se han empezado a utilizar como tratamiento de primera línea, elevando la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, no fumadores, respecto a la quimioterapia con cisplatino (Mok *et al.*, 2009). Se ha comprobado que la eficacia aumenta en terapias combinadas, administrando gefitinib o erlotinib después del

tratamiento con radioterapia y quimioterapia (cisplatino) (Gatzemeier *et al.*, 2007; Herbst *et al.*, 2004).

Los resultados presentados en esta tesis doctoral, demuestran que el Minerval disminuye significativamente, *in vivo* e *in vitro*, la fosforilación de EGFR en células de cáncer de pulmón no microcítico y en glioma. El hecho de que el tratamiento *in vitro* con Minerval no afecte a la fosforilación de EGFR en células no tumorales MRC5, pone de manifiesto su baja toxicidad. Dado que se ha observado que el 30% de pacientes con mutaciones en EGFR, presentan resistencia a la terapia con inhibidores de tirosín quinasa (Bell *et al.*, 2005; Benedettini *et al.*, 2010) y que más del 40% de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico o glioma presentan mutaciones somáticas en el dominio tirosín quinasa de EGFR o amplificaciones del gen (Kosaka *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2004; Pelloski *et al.*, 2007) el Minerval sería aproximación terapéutica eficaz para abordar el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico y del glioma.

Diferentes trabajos de investigación de finales del siglo XX, ponían de manifiesto que quimioterápicos como el cisplatino o la doxorubicina tenían como primera diana la membrana lipídica, actuando sobre canales iónicos y transducción de señales celulares, lo cual contribuía a sus efectos antitumorales (de Wolf *et al.*, 1993; Grunicke y Hofmann, 1992; Posada *et al.*, 1989). El cisplatino interactúa con fosfolípidos de membrana como la fosfatidilserina, con la cual forma complejos estables que median en su citotoxicidad (Speelmans *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1995). La doxorubicina se une concretamente a fosfolípidos aniónicos como el ácido fosfatídico y la fosfatidilserina (Goormaghtigh *et al.*, 1980), induciendo el desorden de sus cadenas acílicas (de Wolf *et al.*, 1993). Además, la citotoxicidad de un fármaco antitumoral está relacionada, entre otros factores, con su interacción con la membrana plasmática y los cambios en la estructura de dicha membrana derivados de tal interacción (Escriba *et al.*, 1990; Escriba *et al.*, 1995). En este contexto, diversos estudios llevados a cabo con antraciclinas, pusieron de manifiesto que a concentraciones terapéuticas, estas incrementaban la fluidez de la membrana (Lameh *et al.*, 1989; Oth *et al.*, 1987). Estos resultados concuerdan con diferentes trabajos de investigación que demuestran que células de cáncer de pulmón no microcítico A549 y células de adenocarcinoma colorectal HT29, presentan más o menos resistencia frente al cisplatino en función de la

composición y la fluidez de la membrana plasmática (Huang *et al.*, 2003; Lacour *et al.*, 2004).

Estos resultados concuerdan, con estudios sobre la acción del Minerval sobre proteínas de membrana como PKC α , provocando su translocación a la membrana, su activación y la regulación de la expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular (Martínez *et al.*, 2005b) así como la translocación de RAS de la membrana al citoplasma observada en esta Tesis Doctoral.

En este contexto, se ha observado en estudios *in vitro*, la incorporación del Minerval a fosfolípidos de membrana (Martín *et al.*, datos enviados para su publicación). Asimismo, en células tumorales tratadas con Minerval se indujo un incremento de esfingomielina (SM) produciendo cambios en la composición lipídica de la membrana y por tanto en su fluidez (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011). El Minerval induce una activación de la SMS, un componente clave en la membrana que interactúa con el colesterol y los glicerofosfolípidos participando en la formación y el mantenimiento de los microdominios de la membrana, principalmente los denominados *lipid raft* (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2003; de Almeida *et al.*, 2005). Por tanto las modificaciones en el contenido de SM inducidas por el Minerval podrían afectar a la señalización asociada a los *lipid rafts*. Estos cambios en la membrana explicarían el cambio de distribución de la proteína G pequeña RAS, observado en el presente trabajo, provocando su translocación de la membrana plasmática al citoplasma, provocando así la inhibición de la cascada de proliferación de las MAPKs. El aumento de SM y de Minerval en las membranas tienen evitan las interacciones EGFR/RAS y RAS/Raf, ya que éstos contactos se producen en la membrana, inhibiendo así las vías de señalización aunque RAS esté activado de forma constitutiva. En este sentido, otros estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la regulación de ciertos antitumorales ejercen sobre la membrana, provoca la traslocación de proteínas G heterotriméricas desde la membrana al citosol, interfiriendo así en la señalización celular (Escriba *et al.*, 1995).

Las modificaciones en la fluidez de la membrana regulan diferentes vías de señalización y por consiguiente funciones vitales celulares (Donner *et al.*, 1990; lwagaki *et al.*, 1994). Estos cambios en la membrana plasmática suelen estar

relacionados con la organización de los *lipid rafts* (Simons y Sampaio, 2011). Se ha observado un acúmulo del receptor de muerte celular Fas en los *lipid rafts* de la membrana plasmática celular (Delmas *et al.*, 2003; Delmas *et al.*, 2004; Gajate y Mollinedo, 2001; Lacour *et al.*, 2004). Estos resultados concuerdan con lo observado en células de leucemia linfoblástica Jurkat tratadas con Minerval, las cuales presentaban una agrupación del receptor de muerte Fas en los *lipid rafts* de la membrana celular (Llado *et al.*, 2010). En este contexto, se ha observado una redistribución de los microdominios Lo/Ld en membranas modelo cuando se encuentran en presencia de Minerval (Martín *et al.*, Iburguren *et al.*, datos enviados para su publicación).

En este contexto, la señalización mediada por EGFR se lleva a cabo en los microdominios *Lipid Raft* de la membrana plasmática (Simons y Toomre, 2000). Se ha observado que lípidos como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA) modifican la composición lipídica y disminuyen significativamente la localización de EGFR en los *lipid rafts* (Rogers *et al.*, 2010; Schley *et al.*, 2007), evitando así la señalización de las vías que a través de EGFR estimulan la proliferación, la invasión y la metástasis (Carpenter, 2000; Kim *et al.*, 2001; Salomon *et al.*, 1995). Recientemente, se ha comprobado que la actividad de EGFR puede ser regulada mediante la modificación de su entorno lipídico, mostrando como la adición del gangliosido GM3 inhibe la fosforilación de EGFR sin afectar a la unión del ligando al receptor (Coskun *et al.*, 2011), demostrando que el entorno lipídico no afecta a la unión de EGF al receptor sino que son las interacciones entre EGFR y los lípidos de la membrana lo que afecta a la función Tirosina Quinasa de EGFR (Coskun *et al.*, 2011). La redistribución y el aumento de la fluidez de la membrana plasmática producida por el Minerval, provocaría también una redistribución en los *lipid rafts*, que podría afectar a la señalización canalizada por EGFR y a la rápida y marcada disminución de la fosforilación de EGFR observada en células de cáncer de pulmón no microcítico y en células de glioma tratadas con Minerval.

En conjunto, estos resultados sumados a las observaciones constatadas anteriormente en nuestro grupo de investigación, sugieren que el incremento de SM y Minerval en la membrana de las células tumorales, podrían ser el motor de actuación, afectando a la señalización de proteínas de membrana como EGFR y

RAS que verían afectada su interacción con otras proteínas de las cascadas de señalización celular.

5.3. Efecto del Minerval sobre la vías MAPK y Akt-FoxO1

En el apartado anterior se ha descrito el efecto del Minerval sobre la activación de EGFR y Ras, que a su vez está relacionada con la activación de la vía Akt (Li *et al.*, 1994). La vía de señalización de Akt se ha identificado como una potencial diana terapéutica en el cáncer de pulmón no microcítico, ya que frecuentemente se encuentra activada de forma constitutiva en este tipo de cáncer de pulmón (David, 2001; Tang *et al.*, 2006) y por tanto se le otorga un papel importante en la carcinogénesis (Vivanco y Sawyers, 2002).

La activación aberrante de la vía Akt se correlaciona con resistencia al gefinitib y con una peor prognosis en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico (Janmaat *et al.*, 2003). Esto sugiere que líneas celulares resistentes al gefitinib como la línea celular A549, que presentan mutaciones constitutivas en la activación de K-RAS, necesitan terapias con múltiples dianas en la cascada de proliferación celular para conseguir una mayor efectividad en la inhibición de la misma.

En este trabajo de investigación, se ha observado *in vitro* e *in vivo*, en cáncer de pulmón no microcítico A549 y en glioma humano SF-767, que el Minerval inactiva la vía de señalización mediada por Akt. Por el contrario, quimioterápicos de primera elección en estos tipos de cáncer como Cisplatino o el Erlotinib no inactivaron la vía de Akt *in vivo*.

El Minerval inhibió la fosforilación de PDK1 en células de cáncer de pulmón no microcítico A549, *in vitro* e *in vivo*, evitando la fosforilación del residuo Thr 308 que y la fosforilación del residuo Ser 473, ambas condiciones necesarias para la total activación de Akt (Alessi *et al.*, 1996). Esta inhibición del Minerval observada en la fosforilación de Akt fue acompañada de un incremento en la expresión de la fosfatasa PTEN, la cual regula negativamente la vía de señalización mediada por Akt (Stambolic *et al.*, 1998).

Como ya se ha reseñado en la introducción, Akt fosforila factores de transcripción de la familia FoxO, provocando su secuestro en el citoplasma e impidiendo su

unión al ADN. De esta forma, se inhibe la transcripción de genes dependientes de FoxO, como p21^{CIP1} y p27^{KIP1} que regulan negativamente el ciclo celular (Van Der Heide *et al.*, 2004). En conjunto los resultados presentados en esta tesis doctoral, demuestran que el tratamiento con Minerval en células de cáncer de pulmón no microcítico A549 y de glioma humano SF-767 inhiben la fosforilación de Akt promoviendo la entrada de FoxO1 al núcleo, incrementando la expresión de los genes de p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, que promueven la parada del ciclo celular. Por el contrario, el tratamiento con Minerval no afectó la localización de FoxO1 en células no tumorales MRC5, lo que demuestra su especificidad contra células no tumorales.

La vía de señalización de las MAPKs, en especial ERK, se encuentra activada por señales de crecimiento que se unen a sus receptores en la membrana celular (Lubinus *et al.*, 1994) y su activación provoca la fosforilación y la inactivación de los factores FoxO (Roy *et al.*, 2011). Asimismo la activación constitutiva de RAS y/o ERK promueven el crecimiento descontrolado y por tanto la carcinogénesis (Marshall, 1995).

La localización de los factores FoxO puede verse regulada por la vía de señalización de las MAPKs, a través de su fosforilación e inactivación. En los resultados presentados se ha observado que el Minerval inhibe la vía de las MAPK en células de cáncer de pulmón no microcítico A549 y glioma humano SF-767, regulando así también la actividad de los factores FoxO.

En concordancia con estos resultados, experimentos anteriores demostraron que el Minerval inhibía la proliferación celular en células de glioma SF-767 y células de cáncer de pulmón no microcítico A549, de forma dependiente de la dosis y el tiempo, sin inducir apoptosis (Llado *et al.*, 2009).

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo experimental demuestran que el Minerval induce la expresión de PTEN e inhibe la fosforilación de Akt, ERK y FoxO1, lo cual conduce a la parada del ciclo celular. Habiéndose demostrado en la literatura científica que la vía de Akt regula la progresión del ciclo celular mediante la regulación de los factores de transcripción FoxO (Cappellini *et al.*, 2003) y con el conjunto de resultados experimentales presentados en este

apartado, se puede deducir que el tratamiento con Minerval provoca la parada del ciclo celular en G1 a través de la translocación de FoxO1 al núcleo.

5.4. El Minerval induce parada del ciclo celular y diferenciación celular *in vitro* e *in vivo*.

La mayoría de los gliomas presentan sobreactivación de la vía RAS/MAPK debido a la activación constitutiva o la sobreexpresión de receptores tirosín quinasa (EGFR, PDGFR), RAS o Raf (Guha *et al.*, 1997; Ohgaki y Kleihues, 2009; Parsa y Holland, 2004; Tatevossian *et al.*, 2010). Además como se ha expuesto anteriormente en la introducción, las vías RAS/MAPK y PI3K/Akt están implicadas en la pérdida de diferenciación celular, así como en el incremento de la proliferación y la supervivencia celular, lo cual conlleva a la transformación maligna de las células de glía en gliomas (Harrisingh y Lloyd, 2004; Parsa y Holland, 2004; Tatevossian *et al.*, 2010).

En investigaciones anteriores llevadas a cabo por Martínez *et al.* 2005, se observaba que el Minerval inhibía la expresión de las Ciclinas D1, D3 y E así como de CDK 2 y 4 en células A549. Estos resultados concuerdan con lo descrito en el apartado anterior donde se expone que la translocación inducida por el Minerval, en células de cáncer de pulmón no microcítico A549 y de glioma SF-767, de FoxO1 del citoplasma al núcleo aumenta la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21^{CIP1} y p27^{KIP}. *In vivo*, en xenotrasplantes de ratones tratados con Minerval se observó también el aumento de la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21^{CIP1} y p27^{KIP}.

Para confirmar esta hipótesis, se estudiaron ciclinas y CDKs implicadas en el control del ciclo celular. Se observó que células de glioma humano SF-767 tratadas con Minerval inhibieron la expresión de las Ciclinas D1, D3 y Ciclina E, así como las CDKs 4, 6 y 2, induciendo la parada del ciclo celular en fase G1. A continuación, se investigó la expresión de las ciclinas y CDKs en tejidos *ex vivo* de xenotrasplantes de células SF-767, observando una significativa disminución de las Ciclinas D1, D3 y Ciclina E, así como las CDKs 4, 6 y 2. Estos resultados confirman la hipótesis de que el Minerval disminuye la proliferación celular y este podría ser uno de los posibles mecanismos responsables del no crecimiento de

tumores observado *in vivo*, tanto de xenotrasplantes de células de cáncer de pulmón no microcítica A549 y glioma humano SF-767, en ratones desnudos tratados con Minerval. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Minerval induce la sobreexpresión de CKIs como p21^{CIP1} y p27^{KIP1} tanto en células de glioma SF-767 como en células de pulmón no microcítico A549, así como en los xenotrasplantes de cáncer de pulmón no microcítico y glioma humano en ratones desnudos tratados con Minerval, en los que los niveles de p21^{CIP1} y p27^{KIP1} aumentaron significativamente respecto a los tratados con vehículo, Temozolomida, Cisplatino o Erlotinib.

Trabajos de investigación anteriores en células de cáncer de pulmón no microcítico A549 tratadas con Minerval, pusieron de manifiesto que la sobreexpresión de p21^{CIP1} inducía la hipofosforilación de pRb, lo cual evitaba la liberación del factor E2F1 en estas células (Martinez *et al.*, 2005a). Estudios posteriores en diferentes líneas celulares tumorales (A549, U118, Jurkat) demostraron que el Minerval inhibe la enzima DHFR en estas células (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011; Llado *et al.*, 2009). Para confirmar la hipótesis de que el Minerval contribuye a la diferenciación de células tumorales, como las células de glioma SF-767, investigamos dos marcadores de diferenciación en xenotrasplantes *in vivo* y *ex vivo*.

La literatura científica define ampliamente que los marcadores de diferenciación de las células de la glía, GFAP y Glutamina Sintetasa, se encuentran muy reducidos en células de glioma indiferenciadas (de Hemptinne *et al.*, 2004; Domowicz *et al.*, 2008; Eng *et al.*, 2000; Rutka *et al.*, 1994; Toda *et al.*, 1994). La reducción de estos marcadores de diferenciación se afectan directamente por la sobreactivación de la vía MEK/ERK (Lind *et al.*, 2006). En este contexto, para confirmar nuestra hipótesis de que el Minerval induce la diferenciación de células tumorales, investigamos *in vivo* y *ex vivo*, los marcadores de diferenciación celular GFAP y Glutamina Sintetasa. Observamos *in vivo* que en xenotrasplantes de células de glioma humano SF-767 de ratones desnudos tratados con Minerval, los niveles de expresión de GFAP y Glutamina Sintetasa se incrementaron significativamente respecto a ratones tratados con Temozolomida o tratados con vehículo. Asimismo, se observó *in vivo* mediante marcaje con sonda para Glutamina Sintetasa, que el marcaje en los tumores de glioma humano SF-767 en ratones tratados con

Minerval fue tres veces mayor que el marcaje de ratones tratados con vehículo o Temozolomida. Estos resultados concuerdan con otro trabajo de investigación (Terés et al. Datos no publicados), en el cual se observó *in vitro* en células de glioma humano SF-767 un aumento en la expresión de GFAP y de Glutamina Sintetasa.

Asimismo, se ha observado que los cambios en la composición de la membrana lipídica producidos por un aumento de esfingomielinina en células de glioma humano U118 tratadas con Minerval, contribuyen a la propensión a formar fases no lamelares en la membrana plasmática (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011), lo que dificultaría la unión de RAS a la membrana. Esto concuerda con lo descrito anteriormente en esta Tesis Doctoral en la que se ha observado *in vitro* la translocación de RAS de la membrana plasmática al citoplasma en células de glioma humano SF-767 tratadas con Minerval con la subsiguiente inhibición de la vía de las MAPKs. En base a todos los resultados comentados, investigamos la vía de las MAPKs en xenotrasplantes de glioma humano SF-767. Se observó que los niveles de MEK y ERK disminuyeron significativamente más de un 75% en tumores de ratones tratados con Minerval, mientras que no se observaron cambios en la fosforilación de ERK en tumores de ratones tratados con Temozolomida.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el Minerval no solo induce parada del ciclo celular tanto *in vivo* como *in vitro*, sino que además induce diferenciación celular en células de glioma humano SF-767.

5.5. El Minerval induce autofagia en células de glioma y xenotrasplantes de glioma humano.

La autofagia es un mecanismo alternativo de muerte celular (también denominada muerte celular de tipo II, para diferenciarlo de la apoptosis, que es denominada muerte celular de tipo I), que puede vencer la resistencia a la apoptosis de algunos tipos de cáncer como el glioma (Lefranc *et al.*, 2005). Los marcadores de autofagia ATG5 y LC3B, son fundamentales para la formación de autofagosomas y la culminación del proceso de autofagia (Ferraro y Cecconi, 2007). Los estudios realizados por citometría de flujo en células de glioma humano SF-767 tratadas con Minerval, indican que no se produce muerte celular por apoptosis. No se

observó activación/proteólisis de caspasas, ni degradación de PARP ni un incremento en el pico Sub-G1 del ciclo celular.

Por ello, investigamos los marcadores de autofagia ATG5 y LC3B *in vitro* e *in vivo* en células de glioma humano SF-767. En células y en xenotrasplantes de glioma humano SF-767, se observó un incremento significativo de los marcadores de autofagia ATG5 y LC3B. El aumento de estos marcadores de autofagia no se constató en tratamientos con vehículo o con Temozolomida. Estos resultados concuerdan con la fosforilación de pRB y la inhibición de Akt observada en tratamientos con Minerval de células y xenotrasplantes de glioma humano (células SF-767) y cáncer de pulmón no microcítico (células A549). Estos resultados vienen apoyados por el trabajo de Jiang *et al.* 2010 en el que demuestran que la inducción de autofagia en glioma está favorecida por la fosforilación de pRB y la inhibición de Akt mediada por p27^{KIP1}.

Por otra parte, estudios de microscopía electrónica en células de glioma humano SF-767 mostraron que células tratadas con Minerval presentaron una elevada fragmentación celular y liberación de cuerpos citosólicos que contenían cisternas del retículo endoplásmico, las cuales aumentaron en función de la dosis y el tiempo de tratamiento con Minerval. Por tanto, los resultados obtenidos por microscopía electrónica están en concordancia con los procesos celulares típicos en autofagia.

En resumen, estos resultados ponen de manifiesto que el Minerval induce autofagia en células de glioma humano SF-767, datos que también vienen apoyados por el trabajo experimental de Marcilla-Etxenique *et al.* (enviado para su publicación) en el cual se muestra que el Minerval induce autofagia en células de astrocitoma 1321N1 y no en células no tumorales de fibroblastos embrionarios de pulmón humanos MRC5.

5.6. El Minerval como posible fármaco candidato en la terapia del cáncer de pulmón no microcítico y el glioma

En esta Tesis Doctoral se pone de manifiesto que el Minerval posee un efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* en células de glioma humano SF-767 y en células de cáncer de pulmón no microcítico A549.

Los resultados obtenidos en este trabajo de experimentación y en concordancia con las publicaciones hasta la fecha en la literatura, muestran que el Minerval actúa sobre las principales vías de señalización induciendo la diferenciación y la proliferación celular (Figura 58). Además, el Minerval actúa sobre las vías de: EGFR, RAS-MAPK y Akt-FoxO en células tumorales con mayor eficacia que los quimioterápicos del actual arsenal terapéutico para el tratamiento del cáncer pulmón no microcítico y del glioma (Figura 58). Por otro lado, el Minerval no afectó a estas vías en fibroblastos embrionarios de pulmón no tumorales MRC5.

Tampoco se observaron efectos adversos destacables del Minerval en estudios regulatorios de toxicidad en ratón, rata y perro (Tablas 5 y 6) sugiriendo ausencia de toxicidad en los tratamientos con Minerval, tanto agudos como crónicos.

Una cuestión importante es porqué la misma molécula puede ser eficaz en dos tipos de cáncer tan alejados. Recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que todas las líneas celulares tumorales estudiadas, presentan niveles bajos de SM (esfingomielina) y aumento de PE (fosfatidiletanolamina) (Barcelo-Coblijn *et al.*, 2011). Esta composición de la membrana con ratios PE:SM del orden de 5 a 7 (frente a valores de 0,8 a 1,5 en células no tumorales) permite la activación de ciertas proteínas de membrana implicadas en la proliferación celular. Asimismo, esta composición de membrana es necesaria para el proceso de citoquinesis, que acaba con la división de una célula madre en dos células hijas (Emoto *et al.*, 1996). Si los niveles bajos de SM parecen ser una característica común a todas las células tumorales estudiadas hasta ahora, la activación de la SMS (esfingomielina sintasa) mediada por el Minerval y el consiguiente aumento en los niveles de SM, pueden constituir un mecanismo terapéutico de amplio espectro en el tratamiento de procesos oncológicos.

En resumen, los resultados globales de esta Tesis Doctoral y las evidencias de trabajos anteriores, sugieren que el Minerval por su baja toxicidad y su elevada efectividad por vía oral frente a quimioterápicos al uso en estas patologías, le hacen un candidato a convertirse en un fármaco en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico y el glioma.

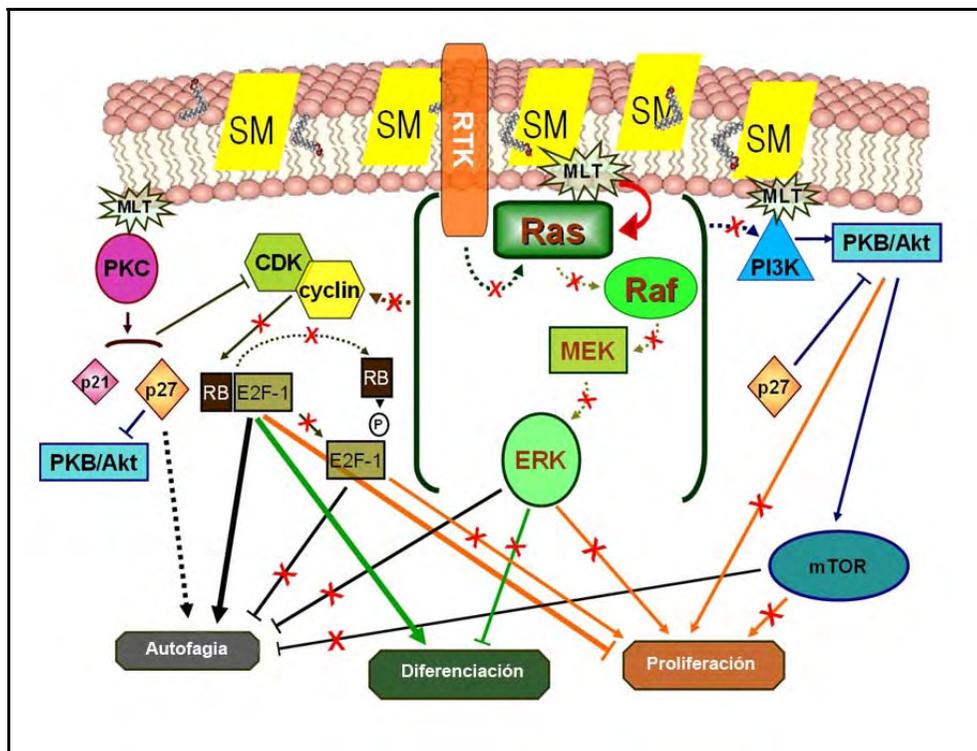


Figura 58. Mecanismo de acción del Minerval. Las señales que inducen proliferación celular, pérdida de diferenciación y supervivencia, son propagadas a menudo por los receptores Tirocín Quinasas (EGFR) que activan RAS, que a su vez activa Raf. Entonces Raf activa MEK (MAPKK), que finalmente fosforila y activa ERK (MAPK). La vía de señalización RAS/MAPK regula positivamente las vías PI3K/Akt y Ciclinas/CDKs. Las alteraciones en los dominios I_o y I_d inducidas por el Minerval, provoca la traslocación de RAS al citosol evitando las interacciones entre RTK-RAS y RAS-Raf (que solo se dan en la membrana plasmática) y evita la señalización de las vías mencionadas anteriormente. MLT: membrane lipid therapy (Terapia Lipídica de membrana).

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de esta Tesis son las siguientes:

1. La administración crónica del Minerval reduce la progresión de tumores en ratones desnudos inoculados con células de glioma humano SF-767 y cáncer de pulmón no microcítico A549 y no es seguida de recidiva tras la finalización del tratamiento. La eficacia de este compuesto es superior a la de fármacos de referencia en el tratamiento del glioma y del cáncer de pulmón. Los tratamientos combinatorios con dichos fármacos de referencia han mostrado tener una eficacia muy elevada.
2. El Minerval regula importantes vías de señalización celular sin afectar a células no tumorales:
 - a. El Minerval inhibe la vía de señalización EGFR-Akt *in vivo* e *in vitro* en células de glioma humano SF-767 y cáncer de pulmón no microcítico A549.
 - b. El Minerval induce parada del ciclo celular *in vivo* e *in vitro* en células de glioma humano SF-767 y cáncer de pulmón no microcítico A549, regulando la localización del factor de transcripción FoxO1.
 - c. El Minerval inhibe la vía de señalización MAPKs *in vivo* en células de glioma humano SF-767 e *in vitro* en células de cáncer de pulmón no microcítico A549.
3. La regulación de estas vías de señalización provocada por el Minerval, da lugar a:
 - a. El Minerval incrementa los marcadores de diferenciación celular GFAP y Glutamina Sintetasa en tumores derivados de células de glioma humano SF-767.
 - b. El Minerval induce autofagia *in vivo* e *in vitro* en células de glioma humano SF-767.
4. La administración aguda y/o crónica del Minerval no presenta efectos tóxicos ni en ratón, ni en rata ni en perro.

5. Por todo esto, el Minerval podría constituir una herramienta terapéutica muy eficaz en el tratamiento del glioma, cáncer de pulmón no microcítico y probablemente otros tipos de cáncer. Esto ha sido constatado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), que recientemente ha otorgado al Minerval el estatus de fármaco huérfano para el tratamiento del glioma en base a su mayor eficacia y nula toxicidad.

7. PUBLICACIONES

7.1. Publicaciones relacionadas con la Tesis

Terés S*, Llado V*, **Higuera M***, Barceló-Coblijn G, Martin ML, Noguera-Salva MA, Marcilla-Etxenike A, Garcia-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Saus C, Gomez-Pinedo U, Busquets X, Escriba PV. *"2-Hydroxyoleate, a non-toxic membrane binding/Ras inhibitor-like anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy"**Los autores han contribuido por igual

Higuera M*, Terés S*, LLadó V, Barceló-Coblijn G, Busquets X, Escribá PV. *"Minerval inhibits tumor growth in NSCLC cells through altering the EGFR pathway"**Los autores han contribuido por igual. En preparación

7.2. Otras Publicaciones

Martin ML, Barceló-Coblijn G, de Almeida R, Noguera-Salvà MA, Terés S, **Higuera M** Schmitz G, Liebisch G, Escribá PV. *Stearoyl-CoA desaturase inhibition is involved in 2-hydroxyoleic acid antitumor mechanism*. En preparación.

Llado V, Gutiérrez A, Martínez, J, Casas J, Terés S, **Higuera M**, Galmés A, Saus C, Besalduch J, Busquets X, Escribá PV. Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells. *J. Cell. Mol. Med.* 14 659-670 Marzo 2010

Llado V, Terés S, **Higuera M**, Álvarez R, Noguera-Salvà MA, Busquets X, Escribá PV. "Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid" PNAS 106 13754-13758 Agosto 2009

7.3. Patentes

Escribá PV, Busquets X, Terés S, Barceló-Coblijn G, Barceló J, Llado V, Marcilla-Etxenike A, Martin ML, **Higuera M**, Álvarez R, López DH. *Use of 2-hydroxy-poliunsaturated fatty acids as drugs*. P200900725. 09/03/2009

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlberg, J., L. Marzella and H. Glaumann (1982). "Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis." *Lab Invest* **47**(6): 523-32.
- Alemaný, R., S. Teres, C. Baamonde, *et al.* (2004). "2-hydroxyoleic acid: a new hypotensive molecule." *Hypertension* **43**(2): 249-54.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, *et al.* (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." *EMBO J* **15**(23): 6541-51.
- Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, *et al.* (1994). "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1." *EMBO J* **13**(7): 1610-9.
- Andreyev, H. J., A. R. Norman, D. Cunningham, *et al.* (1998). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study." *J Natl Cancer Inst* **90**(9): 675-84.
- Arden, K. C. (2006). "Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer." *Exp Gerontol* **41**(8): 709-17.
- Arellano, M. and S. Moreno (1997). "Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(4): 559-73.
- Arico, S., A. Petiot, C. Bauvy, *et al.* (2001). "The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway." *J Biol Chem* **276**(38): 35243-6.
- Arispe, N. and M. Doh (2002). "Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease AbetaP (1-40) and (1-42) peptides." *FASEB J* **16**(12): 1526-36.
- Arjona, D., M. J. Bello and J. A. Rey (2006). "EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas." *Cancer Genet Cytogenet* **164**(1): 39-43.
- Armstrong, T. S., R. Manning and M. R. Gilbert (2005). Severe myelosuppression with the first course of standard dose temozolomide: The "X" factor. *World Federation of Neuro-Oncology Meeting, 2005*. D. Darel and M. Bigner: 315.
- Athanassiou, H., M. Synodinou, E. Maragoudakis, *et al.* (2005). "Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed glioblastoma multiforme." *J Clin Oncol* **23**(10): 2372-7.
- Athos, J. and D. R. Storm (2001). "High precision stereotaxic surgery in mice." *Curr Protoc Neurosci* **Appendix 4**: Appendix 4A.

- Aussenac, F., M. Tavares and E. J. Dufourc (2003). "Cholesterol dynamics in membranes of raft composition: a molecular point of view from ^2H and ^{31}P solid-state NMR." *Biochemistry* **42**(6): 1383-90.
- Bach, P. B., M. J. Kelley, R. C. Tate, *et al.* (2003). "Screening for lung cancer: a review of the current literature." *Chest* **123**(1 Suppl): 72S-82S.
- Bagatolli, L. A., J. H. Ipsen, A. C. Simonsen, *et al.* (2010). "An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes." *Prog Lipid Res* **49**(4): 378-89.
- Bano, D., K. W. Young, C. J. Guerin, *et al.* (2005). "Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity." *Cell* **120**(2): 275-85.
- Barbacci, E. G., L. R. Pustilnik, A. M. Rossi, *et al.* (2003). "The biological and biochemical effects of CP-654577, a selective erbB2 kinase inhibitor, on human breast cancer cells." *Cancer Res* **63**(15): 4450-9.
- Barcelo-Coblijn, G., E. Hogyes, K. Kitajka, *et al.* (2003). "Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11321-6.
- Barcelo-Coblijn, G., M. L. Martin, R. F. de Almeida, *et al.* (2011). "Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003). "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer." *Cancer Cell* **3**(5): 421-9.
- Baselga, J. (2002). "Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy." *Oncologist* **7 Suppl 4**: 2-8.
- Baumgart, T., S. T. Hess and W. W. Webb (2003). "Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension." *Nature* **425**(6960): 821-4.
- Belinsky, S. A., K. C. Liechty, F. D. Gentry, *et al.* (2006). "Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort." *Cancer Res* **66**(6): 3338-44.
- Bell, D. W., I. Gore, R. A. Okimoto, *et al.* (2005). "Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR." *Nat Genet* **37**(12): 1315-6.
- Bellacosa, A., D. de Feo, A. K. Godwin, *et al.* (1995). "Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas." *Int J Cancer* **64**(4): 280-5.

- Benedettini, E., L. M. Sholl, M. Peyton, *et al.* (2010). "Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis." *Am J Pathol* **177**(1): 415-23.
- Bertram, J. (2001). "The molecular biology of cancer." *Molecular Aspects of Medicine* **21**(6): 167-223.
- Bialik, S. and A. Kimchi (2008). "Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development." *Adv Exp Med Biol* **615**: 177-200.
- Bishop, J. a. W., RA (1996). *Molecular oncology*, New York Scientific American Inc.
- Blagosklonny, M. V. (2002). "Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs." *Leukemia* **16**(4): 455-62.
- Blalock, W. L., C. Weinstein-Oppenheimer, F. Chang, *et al.* (1999). "Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs." *Leukemia* **13**(8): 1109-66.
- Blommaart, E. F., J. J. Luiken, P. J. Blommaart, *et al.* (1995). "Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes." *J Biol Chem* **270**(5): 2320-6.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." *Nature* **411**(6835): 355-65.
- Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, *et al.* (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* **11**(2): 529-41.
- Braun, B. S. and K. Shannon (2008). "Targeting Ras in myeloid leukemias." *Clin Cancer Res* **14**(8): 2249-52.
- Bredel, M. (2001). "Anticancer drug resistance in primary human brain tumors." *Brain Res Brain Res Rev* **35**(2): 161-204.
- Brenner, H., S. Francisci, R. de Angelis, *et al.* (2009). "Long-term survival expectations of cancer patients in Europe in 2000-2002." *Eur J Cancer* **45**(6): 1028-41.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt and G. Giaccone (2005). "Cell death independent of caspases: a review." *Clin Cancer Res* **11**(9): 3155-62.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, *et al.* (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.

- Cappellini, A., G. Tabellini, M. Zweyer, *et al.* (2003). "The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway regulates cell cycle progression of HL60 human leukemia cells through cytoplasmic relocalization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) and control of cyclin D1 expression." *Leukemia* **17**(11): 2157-67.
- Carpenter, G. (2000). "The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling." *Bioessays* **22**(8): 697-707.
- Carpten, J. D., A. L. Faber, C. Horn, *et al.* (2007). "A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer." *Nature* **448**(7152): 439-44.
- Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, *et al.* (2004). "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." *Oncogene* **23**(16): 2825-37.
- Chan, E. Y., S. Kir and S. A. Tooze (2007). "siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy." *J Biol Chem* **282**(35): 25464-74.
- Chan, F. K., J. Zhang, L. Cheng, *et al.* (1995). "Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2682-8.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**(6824): 37-40.
- Chauffert, B., M. T. Dimanche-Boitrel, C. Garrido, *et al.* (1998). "New insights into the kinetic resistance to anticancer agents." *Cytotechnology* **27**(1-3): 225-235.
- Chauhan, N. B. (2003). "Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease." *J Lipid Res* **44**(11): 2019-29.
- Chen, C. A. and D. R. Manning (2001). "Regulation of G proteins by covalent modification." *Oncogene* **20**(13): 1643-52.
- Cheng, J. Q., B. Ruggeri, W. M. Klein, *et al.* (1996). "Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3636-41.
- Cheng, M., P. Olivier, J. A. Diehl, *et al.* (1999). "The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts." *EMBO J* **18**(6): 1571-83.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, *et al.* (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* **81**(4): 505-12.

- Chuang, C. F. and S. Y. Ng (1994). "Functional divergence of the MAP kinase pathway. ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors." *FEBS Lett* **346**(2-3): 229-34.
- Citron, M., M. Schoenhaus, H. Rothenberg, *et al.* (1994). "O6-methylguanine-DNA methyltransferase in normal and malignant tissue of the breast." *Cancer Invest* **12**(6): 605-10.
- Corner, J. and C. Bailey (2001). *Cancer nursing : care in context*. Oxford, Blackwell Science.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* **2**(9): 647-56.
- Coskun, U., M. Grzybek, D. Drechsel, *et al.* (2011). "Regulation of human EGF receptor by lipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9044-8.
- Crook, T., W. Petrie, C. Wells, *et al.* (1992). "Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease." *Psychopharmacol Bull* **28**(1): 61-6.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (1996). "A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes." *Science* **273**(5274): 501-3.
- Cullis, P. R., M. J. Hope and C. P. Tilcock (1986). "Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes." *Chem Phys Lipids* **40**(2-4): 127-44.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, *et al.* (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* **426**(6963): 194-8.
- Dahia, P. L. (2000). "PTEN, a unique tumor suppressor gene." *Endocr Relat Cancer* **7**(2): 115-29.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-19.
- Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* **13**(22): 2905-27.
- David, O. (2001). "Akt and PTEN: new diagnostic markers of non-small cell lung cancer?" *J Cell Mol Med* **5**(4): 430-3.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, *et al.* (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* **417**(6892): 949-54.

- de Almeida, R. F., A. Fedorov and M. Prieto (2003). "Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts." *Biophys J* **85**(4): 2406-16.
- de Almeida, R. F., L. M. Loura, A. Fedorov, *et al.* (2005). "Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study." *J Mol Biol* **346**(4): 1109-20.
- de Hemptinne, I., C. Vermeiren, J. M. Maloteaux, *et al.* (2004). "Induction of glial glutamate transporters in adult mesenchymal stem cells." *J Neurochem* **91**(1): 155-66.
- de Wolf, F. A., R. W. Staffhorst, H. P. Smits, *et al.* (1993). "Role of anionic phospholipids in the interaction of doxorubicin and plasma membrane vesicles: drug binding and structural consequences in bacterial systems." *Biochemistry* **32**(26): 6688-95.
- Delmas, D., C. Rebe, S. Lacour, *et al.* (2003). "Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells." *J Biol Chem* **278**(42): 41482-90.
- Delmas, D., C. Rebe, O. Micheau, *et al.* (2004). "Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells." *Oncogene* **23**(55): 8979-86.
- Demuth, T. and M. E. Berens (2004). "Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion." *J Neurooncol* **70**(2): 217-28.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, *et al.* (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." *Oncogene* **26**(22): 3279-90.
- Dhillon, A. S., S. Meikle, Z. Yazici, *et al.* (2002). "Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation." *EMBO J* **21**(1-2): 64-71.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, *et al.* (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." *Genes Dev* **12**(22): 3499-511.
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, C. Pals, *et al.* (2000). "Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1)." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9138-48.
- Dikic, I. (2003). "Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 6): 1178-81.
- Dimri, G. P. (2005). "What has senescence got to do with cancer?" *Cancer Cell* **7**(6): 505-12.

- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, *et al.* (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-7.
- Domowicz, M. S., T. A. Sanders, C. W. Ragsdale, *et al.* (2008). "Aggrecan is expressed by embryonic brain glia and regulates astrocyte development." *Dev Biol* **315**(1): 114-24.
- Donepudi, M., A. Mac Sweeney, C. Briand, *et al.* (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." *Mol Cell* **11**(2): 543-9.
- Dong, X. Y., C. Chen, X. Sun, *et al.* (2006). "FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer." *Cancer Res* **66**(14): 6998-7006.
- Donner, M., S. Muller and J. F. Stoltz (1990). "[Importance of membrane fluidity determination]." *J Mal Vasc* **15**(4): 353-8; discussion 358-9.
- Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 177-82.
- Doyle, T. J., T. Mikkelsen and D. Croteau (2005). "Fatal hematologic toxicity with prolonged continuous administration of temozolomide (TMZ) during radiation therapy (RT) in the treatment of newly-diagnosed glioblastoma multiforme (GBM): Report of a phase II trial." *J Clin Oncol* **23**: 125s.
- Dunn, W. A., Jr. (1990). "Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole." *J Cell Biol* **110**(6): 1935-45.
- Dunn, W. A., Jr. (1994). "Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation." *Trends Cell Biol* **4**(4): 139-43.
- Durfee, T., K. Becherer, P. L. Chen, *et al.* (1993). "The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit." *Genes Dev* **7**(4): 555-69.
- El-Deiry, W. S. (2003). "The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity." *Oncogene* **22**(47): 7486-95.
- el-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, *et al.* (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." *Cancer Res* **54**(5): 1169-74.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, *et al.* (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-25.
- Emoto, K., T. Kobayashi, A. Yamaji, *et al.* (1996). "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 12867-72.

- Emuss, V., M. Garnett, C. Mason, *et al.* (2005). "Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF." *Cancer Res* **65**(21): 9719-26.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." *Neurochem Res* **25**(9-10): 1439-51.
- Escriba, P. V. (2006). "Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine." *Trends Mol Med* **12**(1): 34-43.
- Escriba, P. V., A. V. Ferrer-Montiel, J. A. Ferragut, *et al.* (1990). "Role of membrane lipids in the interaction of daunomycin with plasma membranes from tumor cells: implications in drug-resistance phenomena." *Biochemistry* **29**(31): 7275-82.
- Escriba, P. V., P. Morales and A. Smith (2002). "Membrane phospholipid reorganization differentially regulates metallothionein and heme oxygenase by heme-hemopexin." *DNA Cell Biol* **21**(4): 355-64.
- Escriba, P. V., A. Ozaita, C. Ribas, *et al.* (1997). "Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11375-80.
- Escriba, P. V., J. M. Sanchez-Dominguez, R. Alemany, *et al.* (2003). "Alteration of lipids, G proteins, and PKC in cell membranes of elderly hypertensives." *Hypertension* **41**(1): 176-82.
- Escriba, P. V., M. Sastre and J. A. Garcia-Sevilla (1995). "Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7595-9.
- Eskelinen, E. L. (2008). "New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells." *Int Rev Cell Mol Biol* **266**: 207-47.
- Ewen, M. E. (1998). "Regulation of the cell cycle by the Rb tumor suppressor family." *Results Probl Cell Differ* **22**: 149-79.
- Fabian, J. R., I. O. Daar and D. K. Morrison (1993). "Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase." *Mol Cell Biol* **13**(11): 7170-9.
- Fackler, O. T. and R. Grosse (2008). "Cell motility through plasma membrane blebbing." *J Cell Biol* **181**(6): 879-84.
- Faloia, E., G. G. Garrapa, D. Martarelli, *et al.* (1999). "Physicochemical and functional modifications induced by obesity on human erythrocyte membranes." *Eur J Clin Invest* **29**(5): 432-7.

- Fantl, W. J., A. J. Muslin, A. Kikuchi, *et al.* (1994). "Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins." *Nature* **371**(6498): 612-4.
- Ferguson, K. M. (2004). "Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 742-5.
- Fernandez de Mattos, S., A. Essafi, I. Soeiro, *et al.* (2004). "FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism." *Mol Cell Biol* **24**(22): 10058-71.
- Ferraro, E. and F. Cecconi (2007). "Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells." *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 210-9.
- Ferreira, R., L. Magnaghi-Jaulin, P. Robin, *et al.* (1998). "The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10493-8.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, A. Romagnoli, *et al.* (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." *Nature* **447**(7148): 1121-5.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infect Immun* **73**(4): 1907-16.
- Finberg, N. and W. S. El-Deiry (2004). "Activating FOXO3a, NF-kappaB and p53 by targeting IKKs: an effective multi-faceted targeting of the tumor-cell phenotype?" *Cancer Biol Ther* **3**(7): 614-6.
- Foulds, L. (1954). *The experimental study of Tumor progression*. London, Academic Press.
- Frangopol, P. T., Mih, abreve, *et al.* (2001). "Interactions of some local anesthetics and alcohols with membranes." *Colloids Surf B Biointerfaces* **22**(1): 3-22.
- Fruman, D. A., R. E. Meyers and L. C. Cantley (1998). "Phosphoinositide kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507.
- Funari, S. S., F. Barcelo and P. V. Escriba (2003). "Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes." *J Lipid Res* **44**(3): 567-75.
- Funari, S. S., J. Prades, P. V. Escriba, *et al.* (2005). "Farnesol and geranylgeraniol modulate the structural properties of phosphatidylethanolamine model membranes." *Mol Membr Biol* **22**(4): 303-11.
- Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, *et al.* (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." *Genes Dev* **21**(21): 2683-710.

- Furuta, S., E. Hidaka, A. Ogata, *et al.* (2004). "Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase." *Oncogene* **23**(22): 3898-904.
- Gajate, C. and F. Mollinedo (2001). "The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells." *Blood* **98**(13): 3860-3.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, *et al.* (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* **19**(1): 107-20.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (1999). "Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene." *Exp Cell Res* **246**(2): 280-9.
- Gatzemeier, U., A. Pluzanska, A. Szczesna, *et al.* (2007). "Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial." *J Clin Oncol* **25**(12): 1545-52.
- Geng, Y., W. Whoriskey, M. Y. Park, *et al.* (1999). "Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E." *Cell* **97**(6): 767-77.
- Giacinti, C. and A. Giordano (2006). "RB and cell cycle progression." *Oncogene* **25**(38): 5220-7.
- Gill, G. N., T. Kawamoto, C. Cochet, *et al.* (1984). "Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity." *J Biol Chem* **259**(12): 7755-60.
- Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez, *et al.* (1991). "Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts." *Cell* **67**(6): 1169-79.
- Globocan (2008). "<http://globocan.iarc.fr/>."
- Goldstein, N. I., M. Prewett, K. Zuklys, *et al.* (1995). "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." *Clin Cancer Res* **1**(11): 1311-8.
- Goormaghtigh, E., P. Chatelain, J. Caspers, *et al.* (1980). "Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids." *Biochim Biophys Acta* **597**(1): 1-14.
- Grassme, H., A. Riehle, B. Wilker, *et al.* (2005). "Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms." *J Biol Chem* **280**(28): 26256-62.

- Greer, E. L. and A. Brunet (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." *Oncogene* **24**(50): 7410-25.
- Greer, E. L., P. R. Oskoui, M. R. Banko, *et al.* (2007). "The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor." *J Biol Chem* **282**(41): 30107-19.
- Group, N. C. (1995). "Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group." *BMJ* **311**(7010): 899-909.
- Grunicke, H. and J. Hofmann (1992). "Cytotoxic and cytostatic effects of antitumor agents induced at the plasma membrane level." *Pharmacol Ther* **55**(1): 1-30.
- Guan, K. L., C. W. Jenkins, Y. Li, *et al.* (1994). "Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function." *Genes Dev* **8**(24): 2939-52.
- Gudinaviciene, I., D. Pranyš and E. Juozaityte (2004). "Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas." *Medicina (Kaunas)* **40**(2): 112-20.
- Guha, A., M. M. Feldkamp, N. Lau, *et al.* (1997). "Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation." *Oncogene* **15**(23): 2755-65.
- Ha, H. C. and S. H. Snyder (1999). "Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13978-82.
- Hahn, W. C., C. M. Counter, A. S. Lundberg, *et al.* (1999). "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." *Nature* **400**(6743): 464-8.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: The Next Generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hannon, G. J. and D. Beach (1994). "p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest." *Nature* **371**(6494): 257-61.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, *et al.* (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *Cell* **75**(4): 805-16.
- Harrisingh, M. C. and A. C. Lloyd (2004). "Ras/Raf/ERK signalling and NF1." *Cell Cycle* **3**(10): 1255-8.

- Hatada, I. and T. Mukai (1995). "Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse." *Nat Genet* **11**(2): 204-6.
- Haworth, R. A. and D. R. Hunter (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site." *Arch Biochem Biophys* **195**(2): 460-7.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Hendrich, A. B. and K. Michalak (2003). "Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells." *Curr Drug Targets* **4**(1): 23-30.
- Hengst, L. and S. I. Reed (1996). "Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle." *Science* **271**(5257): 1861-4.
- Henschke, C. I., D. F. Yankelevitz, D. M. Libby, *et al.* (2006). "Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening." *N Engl J Med* **355**(17): 1763-71.
- Herbst, R. S., G. Giaccone, J. H. Schiller, *et al.* (2004). "Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2." *J Clin Oncol* **22**(5): 785-94.
- Hiyama, K., E. Hiyama, S. Ishioka, *et al.* (1995). "Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers." *J Natl Cancer Inst* **87**(12): 895-902.
- Holland, P. M. and J. A. Cooper (1999). "Protein modification: docking sites for kinases." *Curr Biol* **9**(9): R329-31.
- Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, P. Szyniarowski, *et al.* (2007). "Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2." *Mol Cell* **25**(2): 193-205.
- Hoyt, M. A., L. Totis and B. T. Roberts (1991). "S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function." *Cell* **66**(3): 507-17.
- Hu, M. C., D. F. Lee, W. Xia, *et al.* (2004). "IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a." *Cell* **117**(2): 225-37.
- Huang, F., A. Greer, W. Hurlburt, *et al.* (2009). "The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors." *Cancer Res* **69**(1): 161-70.
- Huang, Z., Y. Tong, J. Wang, *et al.* (2003). "NMR studies of the relationship between the changes of membrane lipids and the cisplatin-resistance of A549/DDP cells." *Cancer Cell Int* **3**(1): 5.

- Hunter, T. (2000). "Signaling--2000 and beyond." *Cell* **100**(1): 113-27.
- Ichimura, K., M. B. Bolin, H. M. Goike, *et al.* (2000). "Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities." *Cancer Res* **60**(2): 417-24.
- Ichimura, K., E. E. Schmidt, H. M. Goike, *et al.* (1996). "Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene." *Oncogene* **13**(5): 1065-72.
- Isaacson, S. R. (2000). "Radiation therapy and the management of intramedullary spinal cord tumors." *J Neurooncol* **47**(3): 231-8.
- Ishida, S., E. Huang, H. Zuzan, *et al.* (2001). "Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4684-99.
- Iwagaki, H., M. Marutaka, M. Nezu, *et al.* (1994). "Cell membrane fluidity in K562 cells and its relation to receptor expression." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **85**(2): 141-9.
- Jackson, E. L., K. P. Olive, D. A. Tuveson, *et al.* (2005). "The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer." *Cancer Res* **65**(22): 10280-8.
- Janmaat, M. L., F. A. Kruyt, J. A. Rodriguez, *et al.* (2003). "Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways." *Clin Cancer Res* **9**(6): 2316-26.
- Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, *et al.* (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." *Nature* **376**(6538): 313-20.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, *et al.* (2006). "Cancer statistics, 2006." *CA Cancer J Clin* **56**(2): 106-30.
- Jendrossek, V. and R. Handrick (2003). "Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers." *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**(5): 343-53.
- Kaelin, W. G., Jr. (1999). "Functions of the retinoblastoma protein." *Bioessays* **21**(11): 950-8.
- Kaestner, K. H., W. Knochel and D. E. Martinez (2000). "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors." *Genes Dev* **14**(2): 142-6.

- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, *et al.* (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." *J Cell Biol* **150**(6): 1507-13.
- Kamb, A., D. Shattuck-Eidens, R. Eeles, *et al.* (1994). "Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus." *Nat Genet* **8**(1): 23-6.
- Kanazawa, T., I. Taneike, R. Akaishi, *et al.* (2004). "Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes." *J Biol Chem* **279**(9): 8452-9.
- Kandel, E. S. and N. Hay (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." *Exp Cell Res* **253**(1): 210-29.
- Kang, S., A. G. Bader and P. K. Vogt (2005). "Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 802-7.
- Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2008). "Ras oncogenes: split personalities." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7): 517-31.
- Katayama, K., A. Nakamura, Y. Sugimoto, *et al.* (2008). "FOXO transcription factor-dependent p15(INK4b) and p19(INK4d) expression." *Oncogene* **27**(12): 1677-86.
- Kato, J. Y., M. Matsuoka, K. Polyak, *et al.* (1994). "Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation." *Cell* **79**(3): 487-96.
- Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciana, E. Ulrich, *et al.* (1997). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB." *Nature* **385**(6616): 544-8.
- Kaur, B., C. Tan, D. J. Brat, *et al.* (2004). "Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas." *J Neurooncol* **70**(2): 229-43.
- Kawamoto, T., J. D. Sato, A. Le, *et al.* (1983). "Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5): 1337-41.
- Keohavong, P., M. A. DeMichele, A. C. Melacrinis, *et al.* (1996). "Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis." *Clin Cancer Res* **2**(2): 411-8.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.

- Kihara, A., Y. Kabeya, Y. Ohsumi, *et al.* (2001). "Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network." *EMBO Rep* **2**(4): 330-5.
- Kim, E. S., F. R. Khuri and R. S. Herbst (2001). "Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)." *Curr Opin Oncol* **13**(6): 506-13.
- King, R. W., P. K. Jackson and M. W. Kirschner (1994). "Mitosis in transition." *Cell* **79**(4): 563-71.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, *et al.* (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *EMBO J* **14**(22): 5579-88.
- Koff, A., M. Ohtsuki, K. Polyak, *et al.* (1993). "Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta." *Science* **260**(5107): 536-9.
- Koh, J., G. H. Enders, B. D. Dynlacht, *et al.* (1995). "Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition." *Nature* **375**(6531): 506-10.
- Kokkinakis, D. M., M. M. Ahmed, R. Delgado, *et al.* (1997). "Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents." *Cancer Res* **57**(23): 5360-8.
- Kolluri, S. K., C. Weiss, A. Koff, *et al.* (1999). "p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells." *Genes Dev* **13**(13): 1742-53.
- Kops, G. J., R. H. Medema, J. Glassford, *et al.* (2002). "Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors." *Mol Cell Biol* **22**(7): 2025-36.
- Kosaka, T., Y. Yatabe, H. Endoh, *et al.* (2006). "Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib." *Clin Cancer Res* **12**(19): 5764-9.
- Kossiakoff, A. A. and A. M. De Vos (1998). "Structural basis for cytokine hormone-receptor recognition and receptor activation." *Adv Protein Chem* **52**: 67-108.
- Kroemer, G. (2003). "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction." *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 433-5.
- Kundu, M. and C. B. Thompson (2008). "Autophagy: basic principles and relevance to disease." *Annu Rev Pathol* **3**: 427-55.

- Lacour, S., A. Hammann, S. Grazide, *et al.* (2004). "Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells." *Cancer Res* **64**(10): 3593-8.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lameh, J., R. Y. Chuang, M. Israel, *et al.* (1989). "Nucleoside uptake and membrane fluidity studies on N-trifluoroacetyl Adriamycin-14-O-hemidipate-treated human leukemia and lymphoma cells." *Cancer Res* **49**(11): 2905-8.
- Lane, R. M. and M. R. Farlow (2005). "Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease." *J Lipid Res* **46**(5): 949-68.
- LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." *Cell Death Differ* **10**(1): 66-75.
- Lee, A. G. (2004). "How lipids affect the activities of integral membrane proteins." *Biochim Biophys Acta* **1666**(1-2): 62-87.
- Lee, M. H., I. Reynisdottir and J. Massague (1995). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." *Genes Dev* **9**(6): 639-49.
- Lefranc, F., J. Brotchi and R. Kiss (2005). "Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis." *J Clin Oncol* **23**(10): 2411-22.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **141**(7): 1117-34.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Lents, N. H., S. M. Keenan, C. Bellone, *et al.* (2002). "Stimulation of the Raf/MEK/ERK cascade is necessary and sufficient for activation and Thr-160 phosphorylation of a nuclear-targeted CDK2." *J Biol Chem* **277**(49): 47469-75.
- Li, R. and A. W. Murray (1991). "Feedback control of mitosis in budding yeast." *Cell* **66**(3): 519-31.
- Li, W., R. Nishimura, A. Kashishian, *et al.* (1994). "A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* **14**(1): 509-17.

- Liang, C., P. Feng, B. Ku, *et al.* (2006). "Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG." *Nat Cell Biol* **8**(7): 688-99.
- Liang, J., J. Zubovitz, T. Petrocelli, *et al.* (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." *Nat Med* **8**(10): 1153-60.
- Lind, C. R., C. W. Gray, A. G. Pearson, *et al.* (2006). "The mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 inhibitor U0126 induces glial fibrillary acidic protein expression and reduces the proliferation and migration of C6 glioma cells." *Neuroscience* **141**(4): 1925-33.
- Liu, L., L. M. Backlund, B. R. Nilsson, *et al.* (2005). "Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas." *J Mol Med (Berl)* **83**(11): 917-26.
- Llado, V., A. Gutierrez, J. Martinez, *et al.* (2010). "Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells." *J Cell Mol Med* **14**(3): 659-70.
- Llado, V., S. Teres, M. Higuera, *et al.* (2009). "Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33): 13754-8.
- Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.
- Louis, D. N. (2006). "Molecular pathology of malignant gliomas." *Annu Rev Pathol* **1**: 97-117.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, *et al.* (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-75.
- Lubinus, M., K. E. Meier, E. A. Smith, *et al.* (1994). "Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts." *J Biol Chem* **269**(13): 9822-5.
- Lui, V. W. and J. R. Grandis (2002). "EGFR-mediated cell cycle regulation." *Anticancer Res* **22**(1A): 1-11.
- Lum, J. J., R. J. DeBerardinis and C. B. Thompson (2005). "Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 439-48.
- Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg (1998). "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes." *Mol Cell Biol* **18**(2): 753-61.

- Luo, Y., J. Hurwitz and J. Massague (1995). "Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1." *Nature* **375**(6527): 159-61.
- Luo, Z., G. Tzivion, P. J. Belshaw, *et al.* (1996). "Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism." *Nature* **383**(6596): 181-5.
- Luostarinen, R., M. Boberg and T. Saldeen (1993). "Fatty acid composition in total phospholipids of human coronary arteries in sudden cardiac death." *Atherosclerosis* **99**(2): 187-93.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, R. Sordella, *et al.* (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* **350**(21): 2129-39.
- Macaluso, M., M. Montanari and A. Giordano (2006). "Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes." *Oncogene* **25**(38): 5263-7.
- MacKinnon, A. C., J. Kopatz and T. Sethi (2010). "The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies." *Br Med Bull* **95**: 47-61.
- Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, *et al.* (1995). "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." *Genes Dev* **9**(8): 935-44.
- Maddika, S., S. R. Ande, S. Panigrahi, *et al.* (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." *Drug Resist Updat* **10**(1-2): 13-29.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J Biol Chem* **273**(22): 13375-8.
- Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, A. Criollo, *et al.* (2007). "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1." *EMBO J* **26**(10): 2527-39.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* **146**(1): 3-15.
- Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, *et al.* (2007). "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo." *Cell Metab* **6**(6): 458-71.
- Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson, *et al.* (1997). "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." *J Biol Chem* **272**(7): 4378-83.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." *Carcinogenesis* **21**(3): 361-70.

- Marshall, M. S. (1995). "Ras target proteins in eukaryotic cells." *FASEB J* **9**(13): 1311-8.
- Martinez, J., A. Gutierrez, J. Casas, *et al.* (2005a). "The repression of E2F-1 is critical for the activity of Minerval against cancer." *J Pharmacol Exp Ther* **315**(1): 466-74.
- Martinez, J., O. Vogler, J. Casas, *et al.* (2005b). "Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of minerval." *Mol Pharmacol* **67**(2): 531-40.
- McDonald, P. H., C. W. Chow, W. E. Miller, *et al.* (2000). "Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3." *Science* **290**(5496): 1574-7.
- Medema, R. H., G. J. Kops, J. L. Bos, *et al.* (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1." *Nature* **404**(6779): 782-7.
- Meier, R. and B. A. Hemmings (1999). "Regulation of protein kinase B." *J Recept Signal Transduct Res* **19**(1-4): 121-8.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2006). "Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease." *Mol Aspects Med* **27**(5-6): 411-25.
- Meijer, A. J. and P. Codogno (2007). "AMP-activated protein kinase and autophagy." *Autophagy* **3**(3): 238-40.
- Mendelsohn, J. and J. Baselga (2003). "Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer." *J Clin Oncol* **21**(14): 2787-99.
- Micelli, S., D. Meleleo, V. Picciarelli, *et al.* (2004). "Effect of sterols on beta-amyloid peptide (A β 1-40) channel formation and their properties in planar lipid membranes." *Biophys J* **86**(4): 2231-7.
- Mikrova, N., H. D. Riordan, J. A. Jackson, *et al.* (2004). "Erythrocyte membrane fatty acid composition in cancer patients." *P R Health Sci J* **23**(2): 107-13.
- Millard, S. S., J. S. Yan, H. Nguyen, *et al.* (1997). "Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest." *J Biol Chem* **272**(11): 7093-8.
- Mitsudomi, T. and Y. Yatabe (2010). "Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer." *FEBS J* **277**(2): 301-8.
- Moberg, K., M. A. Starz and J. A. Lees (1996). "E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry." *Mol Cell Biol* **16**(4): 1436-49.

- Mok, T., Y. L. Wu and L. Zhang (2009). "A small step towards personalized medicine for non-small cell lung cancer." *Discov Med* **8**(43): 227-31.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." *Nature* **374**(6518): 131-4.
- Muller, H., A. P. Bracken, R. Vernell, *et al.* (2001). "E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis." *Genes Dev* **15**(3): 267-85.
- Mulligan, G. and T. Jacks (1998). "The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests." *Trends Genet* **14**(6): 223-9.
- Murthy, S. S., A. Tosolini, T. Taguchi, *et al.* (2000). "Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization." *Cytogenet Cell Genet* **88**(1-2): 38-40.
- Mutter, N. and R. Stupp (2006). "Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond?" *Expert Rev Anticancer Ther* **6**(8): 1187-204.
- Myatt, S. S. and E. W. Lam (2007). "The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(11): 847-59.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-65.
- Nair, P. (2005). "Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression." *Curr. Sci* **88**(6): 890-898.
- Nakatogawa, H., Y. Ichimura and Y. Ohsumi (2007). "Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion." *Cell* **130**(1): 165-78.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, *et al.* (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* **113**(6): 703-16.
- Nguyen, H., D. M. Gitig and A. Koff (1999). "Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1190-201.
- Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, *et al.* (1994). "Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen." *Exp Cell Res* **211**(1): 90-8.
- Norbury, C. and P. Nurse (1992). "Animal cell cycles and their control." *Annu Rev Biochem* **61**: 441-70.

- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-8.
- Nyati, M. K., M. A. Morgan, F. Y. Feng, *et al.* (2006). "Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy." *Nat Rev Cancer* **6**(11): 876-85.
- O'Byrne, K. J., M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, *et al.* (2000). "Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer." *Br J Cancer* **82**(8): 1427-32.
- Oh, P. and J. E. Schnitzer (2001). "Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default." *Mol Biol Cell* **12**(3): 685-98.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2009). "Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas." *Cancer Sci* **100**(12): 2235-41.
- Ohsumi, Y. (2001). "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 211-6.
- Ohtani, K., J. DeGregori and J. R. Nevins (1995). "Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12146-50.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, *et al.* (1995). "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2612-24.
- Oliveira, S., P. M. van Bergen en Henegouwen, G. Storm, *et al.* (2006). "Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy." *Expert Opin Biol Ther* **6**(6): 605-17.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, J. Kreuger, *et al.* (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 359-71.
- Oth, D., M. Begin, P. Bischoff, *et al.* (1987). "Induction, by adriamycin and mitomycin C, of modifications in lipid composition, size distribution, membrane fluidity and permeability of cultured RDM4 lymphoma cells." *Biochim Biophys Acta* **900**(2): 198-208.
- Pagano, M., S. W. Tam, A. M. Theodoras, *et al.* (1995). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." *Science* **269**(5224): 682-5.
- Parry, D., S. Bates, D. J. Mann, *et al.* (1995). "Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product." *EMBO J* **14**(3): 503-11.

- Parry, D., D. Mahony, K. Wills, *et al.* (1999). "Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors." *Mol Cell Biol* **19**(3): 1775-83.
- Parsa, A. T. and E. C. Holland (2004). "Cooperative translational control of gene expression by Ras and Akt in cancer." *Trends Mol Med* **10**(12): 607-13.
- Parsons, D. W., T. L. Wang, Y. Samuels, *et al.* (2005). "Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway." *Nature* **436**(7052): 792.
- Pattingre, S., C. Bauvy and P. Codogno (2003). "Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells." *J Biol Chem* **278**(19): 16667-74.
- Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, *et al.* (2008). "Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes." *Biochimie* **90**(2): 313-23.
- Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, *et al.* (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." *Cell* **122**(6): 927-39.
- Paulovich, A. G. and L. H. Hartwell (1995). "A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage." *Cell* **82**(5): 841-7.
- Pawson, T. and P. Nash (2000). "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction." *Genes Dev* **14**(9): 1027-47.
- Paxinos, G. F. K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA, Academic.
- Pelloski, C. E., K. V. Ballman, A. F. Furth, *et al.* (2007). "Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma." *J Clin Oncol* **25**(16): 2288-94.
- Perona, J. S. and V. Ruiz-Gutierrez (2005). "Triacylglycerol molecular species are depleted to different extents in the myocardium of spontaneously hypertensive rats fed two oleic acid-rich oils." *Am J Hypertens* **18**(1): 72-80.
- Perutz, M. F. (1992). *Protein Structure: new approaches to disease and therapy*, W.H. Freeman and Company.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, E. F. Blommaert, *et al.* (2000). "Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells." *J Biol Chem* **275**(2): 992-8.

- Peyssonnaud, C., S. Provot, M. P. Felder-Schmittbuhl, *et al.* (2000). "Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7068-79.
- Pines, J. (1995). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations." *Adv Cancer Res* **66**: 181-212.
- Plas, D. R. and C. B. Thompson (2003). "Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome." *J Biol Chem* **278**(14): 12361-6.
- Plas, D. R. and C. B. Thompson (2005). "Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving." *Oncogene* **24**(50): 7435-42.
- Polyak, K., J. Y. Kato, M. J. Solomon, *et al.* (1994a). "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." *Genes Dev* **8**(1): 9-22.
- Polyak, K., M. H. Lee, H. Erdjument-Bromage, *et al.* (1994b). "Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals." *Cell* **78**(1): 59-66.
- Posada, J., P. Vichi and T. R. Tritton (1989). "Protein kinase C in adriamycin action and resistance in mouse sarcoma 180 cells." *Cancer Res* **49**(23): 6634-9.
- Potente, M., C. Urbich, K. Sasaki, *et al.* (2005). "Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization." *J Clin Invest* **115**(9): 2382-92.
- Prades, J., S. S. Funari, P. V. Escriba, *et al.* (2003). "Effects of unsaturated fatty acids and triacylglycerols on phosphatidylethanolamine membrane structure." *J Lipid Res* **44**(9): 1720-7.
- Proskuryakov, S. Y., V. L. Gabai and A. G. Konoplyannikov (2002). "Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death." *Biochemistry (Mosc)* **67**(4): 387-408.
- Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka and D. Bar-Sagi (2011). "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web." *Nat Rev Cancer* **11**(11): 761-74.
- Ramaswamy, S., N. Nakamura, I. Sansal, *et al.* (2002). "A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR." *Cancer Cell* **2**(1): 81-91.
- Ramu, A., D. Glaubiger and H. Weintraub (1984). "Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells." *Cancer Treat Rep* **68**(4): 637-41.

- Reddy, E. P., R. K. Reynolds, E. Santos, *et al.* (1982). "A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene." *Nature* **300**(5888): 149-52.
- Reissmann, P. T., H. Koga, R. Takahashi, *et al.* (1993). "Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group." *Oncogene* **8**(7): 1913-9.
- Rickert, P., W. Seghezzi, F. Shanahan, *et al.* (1996). "Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II." *Oncogene* **12**(12): 2631-40.
- Robles, S. J. and G. R. Adami (1998). "Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts." *Oncogene* **16**(9): 1113-23.
- Rodriguez-Viciano, P., P. H. Warne, A. Khwaja, *et al.* (1997). "Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras." *Cell* **89**(3): 457-67.
- Rogers, K. R., K. D. Kikawa, M. Mouradian, *et al.* (2010). "Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association." *Carcinogenesis* **31**(9): 1523-30.
- Roy, S. K., Q. Chen, J. Fu, *et al.* (2011). "Resveratrol inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors through activation of FOXO transcription factors." *PLoS One* **6**(9): e25166.
- Ruas, M. and G. Peters (1998). "The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives." *Biochim Biophys Acta* **1378**(2): F115-77.
- Ruiz-Gutierrez, V., F. J. Muriana, A. Guerrero, *et al.* (1996). "Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources." *J Hypertens* **14**(12): 1483-90.
- Rushworth, L. K., A. D. Hindley, E. O'Neill, *et al.* (2006). "Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2262-72.
- Rutka, J. T., S. L. Hubbard, K. Fukuyama, *et al.* (1994). "Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on the growth, invasion, and adhesion of human astrocytoma cells." *Cancer Res* **54**(12): 3267-72.
- Salomon, D. S., R. Brandt, F. Ciardiello, *et al.* (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* **19**(3): 183-232.
- Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, *et al.* (2004). "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." *Science* **304**(5670): 554.

- Sanger. "<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>."
- Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, *et al.* (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." *Nature* **448**(7155): 811-5.
- Sato, J. D., T. Kawamoto, A. D. Le, *et al.* (1983). "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors." *Mol Biol Med* **1**(5): 511-29.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2435-44.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, *et al.* (1997). "The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants." *Science* **277**(5324): 333-8.
- Schley, P. D., D. N. Brindley and C. J. Field (2007). "(n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells." *J Nutr* **137**(3): 548-53.
- Schmidt, M., S. Fernandez de Mattos, A. van der Horst, *et al.* (2002). "Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D." *Mol Cell Biol* **22**(22): 7842-52.
- Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, *et al.* (2002). "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy." *Cell* **109**(3): 335-46.
- SEER (2007). <http://seer.cancer.gov/seerstat/>.
- Sekido, Y., K. M. Fong and J. D. Minna (2003). "Molecular genetics of lung cancer." *Annu Rev Med* **54**: 73-87.
- Seoane, J., H. V. Le, L. Shen, *et al.* (2004). "Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation." *Cell* **117**(2): 211-23.
- Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." *Nature* **366**(6456): 704-7.
- Shay, J. W., O. M. Pereira-Smith and W. E. Wright (1991). "A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence." *Exp Cell Res* **196**(1): 33-9.
- Sherr, C. J. (1994). "G1 phase progression: cycling on cue." *Cell* **79**(4): 551-5.
- Sherr, C. J. (1996). "Cancer cell cycles." *Science* **274**(5293): 1672-7.

- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-12.
- Shin, I., F. M. Yakes, F. Rojo, *et al.* (2002). "PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization." *Nat Med* **8**(10): 1145-52.
- Siegel, R., E. Ward, O. Brawley, *et al.* (2011). "Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths." *CA Cancer J Clin*.
- Simons, K. and J. L. Sampaio (2011). "Membrane organization and lipid rafts." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(10): a004697.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-9.
- Simopoulos, A. P. (2002). "Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases." *J Am Coll Nutr* **21**(6): 495-505.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* **175**(23): 720-31.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, *et al.* (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Smogorzewska, A. and T. de Lange (2002). "Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells." *EMBO J* **21**(16): 4338-48.
- Soucek, T., R. S. Yeung and M. Hengstschlager (1998). "Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15653-8.
- Speelmans, G., W. H. Sips, R. J. Grisel, *et al.* (1996). "The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration." *Biochim Biophys Acta* **1283**(1): 60-6.
- Stambolic, V., A. Suzuki, J. L. de la Pompa, *et al.* (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." *Cell* **95**(1): 29-39.
- Stark, A. M., A. Nabavi, H. M. Mehdorn, *et al.* (2005). "Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution." *Surg Neurol* **63**(2): 162-9; discussion 169.
- START. (2006). "Oncology in Europe." from <http://startoncology.net/default.jsp>.

- Steelman, L. S., S. C. Pohnert, J. G. Shelton, *et al.* (2004). "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." *Leukemia* **18**(2): 189-218.
- Steiner, P., C. Joynes, R. Bassi, *et al.* (2007). "Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor." *Clin Cancer Res* **13**(5): 1540-51.
- Stirewalt, D. L., K. J. Kopecky, S. Meshinchi, *et al.* (2001). "FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **97**(11): 3589-95.
- Stokoe, D. (2001). "Pten." *Curr Biol* **11**(13): R502.
- Stokoe, D. (2005). "The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer." *Expert Rev Mol Med* **7**(10): 1-22.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, *et al.* (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* **352**(10): 987-96.
- Sul, J. and H. A. Fine (2010). "Malignant gliomas: new translational therapies." *Mt Sinai J Med* **77**(6): 655-66.
- Suzuki, K. and Y. Ohsumi (2007). "Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **581**(11): 2156-61.
- Suzuki, M., R. J. Youle and N. Tjandra (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." *Cell* **103**(4): 645-54.
- Takai, H., A. Smogorzewska and T. de Lange (2003). "DNA damage foci at dysfunctional telomeres." *Curr Biol* **13**(17): 1549-56.
- Takekawa, M., K. Tatebayashi and H. Saito (2005). "Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinases." *Mol Cell* **18**(3): 295-306.
- Talloczy, Z., W. Jiang, H. W. t. Virgin, *et al.* (2002). "Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 190-5.
- Tang, J. M., Q. Y. He, R. X. Guo, *et al.* (2006). "Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis." *Lung Cancer* **51**(2): 181-91.
- Tatebayashi, K., M. Takekawa and H. Saito (2003). "A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway." *EMBO J* **22**(14): 3624-34.

- Tatevossian, R. G., A. R. Lawson, T. Forshew, *et al.* (2010). "MAPK pathway activation and the origins of pediatric low-grade astrocytomas." *J Cell Physiol* **222**(3): 509-14.
- Taylor, K. D., R. Goel, F. H. Shirazi, *et al.* (1995). "Pressure tuning infrared spectroscopic study of cisplatin-induced structural changes in a phosphatidylserine model membrane." *Br J Cancer* **72**(6): 1400-5.
- te Poele, R. H., A. L. Okorokov, L. Jardine, *et al.* (2002). "DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo." *Cancer Res* **62**(6): 1876-83.
- Teres, S., G. Barcelo-Coblijn, M. Benet, *et al.* (2008). "Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(37): 13811-6.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-6.
- Toda, M., M. Miura, H. Asou, *et al.* (1994). "Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by glial fibrillary acidic protein cDNA transfection." *J Neurochem* **63**(5): 1975-8.
- Toyoshima, H. and T. Hunter (1994). "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." *Cell* **78**(1): 67-74.
- Travis, W. D., L. B. Travis and S. S. Devesa (1995). "Lung cancer." *Cancer* **75**(1 Suppl): 191-202.
- Treisman, R. (1996). "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." *Curr Opin Cell Biol* **8**(2): 205-15.
- Triton, T. R. and G. Yee (1982). "The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells." *Science* **217**(4556): 248-50.
- Uberall, I., Z. Kolar, R. Trojanec, *et al.* (2008). "The status and role of ErbB receptors in human cancer." *Exp Mol Pathol* **84**(2): 79-89.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell* **61**(2): 203-12.
- Van Der Heide, L. P., M. F. Hoekman and M. P. Smidt (2004). "The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation." *Biochem J* **380**(Pt 2): 297-309.
- Vereb, G., J. Szollosi, J. Matko, *et al.* (2003). "Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8053-8.

- Verkleij, A. J., R. F. Zwaal, B. Roelofsen, *et al.* (1973). "The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy." *Biochim Biophys Acta* **323**(2): 178-93.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." *Cell Prolif* **36**(3): 131-49.
- Vessey, D. A. and D. Zakim (1974). "Membrane fluidity and the regulation of membrane-bound enzymes." *Horiz Biochem Biophys* **1**: 138-74.
- Viglietto, G., M. L. Motti, P. Bruni, *et al.* (2002). "Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer." *Nat Med* **8**(10): 1136-44.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Vogler, O., J. Casas, D. Capo, *et al.* (2004). "The Gbetagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures." *J Biol Chem* **279**(35): 36540-5.
- Walker, D. H. and J. L. Maller (1991). "Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication." *Nature* **354**(6351): 314-7.
- Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, *et al.* (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." *Cell* **116**(6): 855-67.
- Wang, M. C., D. Bohmann and H. Jasper (2005). "JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling." *Cell* **121**(1): 115-25.
- Wang, W., H. Furneaux, H. Cheng, *et al.* (2000). "HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light." *Mol Cell Biol* **20**(3): 760-9.
- Ward, C. W., M. C. Lawrence, V. A. Streltsov, *et al.* (2007). "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation." *Trends Biochem Sci* **32**(3): 129-37.
- Ware, M. L., M. S. Berger and D. K. Binder (2003). "Molecular biology of glioma tumorigenesis." *Histol Histopathol* **18**(1): 207-16.
- Waring, P. (2005). "Redox active calcium ion channels and cell death." *Arch Biochem Biophys* **434**(1): 33-42.

- Weaver, B. A. and D. W. Cleveland (2005). "Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death." *Cancer Cell* **8**(1): 7-12.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, *et al.* (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science* **292**(5517): 727-30.
- Wei, Y., S. Pattingre, S. Sinha, *et al.* (2008). "JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy." *Mol Cell* **30**(6): 678-88.
- Weinstein, I. B. (2002). "Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer." *Science* **297**(5578): 63-4.
- WHO (1992). *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision*. World Health Organization I.
- Willumeit, R., M. Kumpugdee, S. S. Funari, *et al.* (2005). "Structural rearrangement of model membranes by the peptide antibiotic NK-2." *Biochim Biophys Acta* **1669**(2): 125-34.
- Wistuba, II, C. Behrens, A. K. Virmani, *et al.* (2000a). "High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints." *Cancer Res* **60**(7): 1949-60.
- Wistuba, II, J. Berry, C. Behrens, *et al.* (2000b). "Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **6**(7): 2604-10.
- Yamasaki, L. (1998). "Growth regulation by the E2F and DP transcription factor families." *Results Probl Cell Differ* **22**: 199-227.
- Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, *et al.* (1998). "Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem* **273**(37): 24052-6.
- Yan, Y., J. Frisen, M. H. Lee, *et al.* (1997). "Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development." *Genes Dev* **11**(8): 973-83.
- Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, *et al.* (2008). "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation." *Nat Cell Biol* **10**(2): 138-48.
- Yang, L., L. Ding and H. W. Huang (2003). "New phases of phospholipids and implications to the membrane fusion problem." *Biochemistry* **42**(22): 6631-5.
- Yang, Q., R. Alemany, J. Casas, *et al.* (2005). "Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors." *Mol Pharmacol* **68**(1): 210-7.

- Yarbro, C. H., M. H. Frogge and M. Goodman (2005). *Cancer nursing : principles and practice*. Sudbury, Mass. ; London, Jones and Bartlett.
- Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S3-8.
- Yeagle, P. L. (2005). *The structure of biological membranes*, CRC Press.
- Yeung, K., T. Seitz, S. Li, *et al.* (1999). "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP." *Nature* **401**(6749): 173-7.
- Younsi, M., D. Quilliot, N. Al-Makdissy, *et al.* (2002). "Erythrocyte membrane phospholipid composition is related to hyperinsulinemia in obese nondiabetic women: effects of weight loss." *Metabolism* **51**(10): 1261-8.
- Yuan, J., M. Lipinski and A. Degterev (2003). "Diversity in the mechanisms of neuronal cell death." *Neuron* **40**(2): 401-13.
- Zhang, H., Y. Xiong and D. Beach (1993). "Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes." *Mol Biol Cell* **4**(9): 897-906.
- Zhang, P., N. J. Liegeois, C. Wong, *et al.* (1997). "Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome." *Nature* **387**(6629): 151-8.
- Zhao, M., L. New, V. V. Kravchenko, *et al.* (1999). "Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38." *Mol Cell Biol* **19**(1): 21-30.
- Zhao, Q. and F. S. Lee (1999). "Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta." *J Biol Chem* **274**(13): 8355-8.
- Zhou, B. P., M. C. Hu, S. A. Miller, *et al.* (2000). "HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway." *J Biol Chem* **275**(11): 8027-31.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, *et al.* (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." *Nat Cell Biol* **3**(3): 245-52.
- Zong, W. X. and C. B. Thompson (2006). "Necrotic death as a cell fate." *Genes Dev* **20**(1): 1-15.

Universitat de les Illes Balears
Abril 2012