



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

**PAPEL DEL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA EN
LA RESPUESTA A TERAPIAS ANTIMITÓTICAS Y SU
SIGNIFICADO CLÍNICO EN CÁNCER**

YESICA MARÍA GASCA BELLIDO

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017



Dra. Carmen Sáez Torres y Dr. Miguel Angel Japón Rodriguez,

CERTIFICAN:

Que Yesica María Gasca Bellido ha trabajado bajo su dirección en el trabajo titulado **“Papel del sistema ubiquitina proteasoma en la respuesta a terapias antimitóticas y su significado clínico en cáncer”** que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Yesica María Gasca Bellido

Directores del trabajo de investigación:

Carmen Sáez Torres

Miguel Ángel Japón Rodríguez

Tutor del trabajo de investigación:

Rafael Fernández Chacón

ÍNDICE

<i>ABSTRACT/RESUMEN</i> _____	11
ABSTRACT _____	13
RESUMEN _____	15
<i>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</i> _____	17
<i>INTRODUCCIÓN</i> _____	23
1. Cáncer de mama _____	25
1.1. Epidemiología _____	26
1.2. Factores pronósticos y predictivos _____	26
1.3. Clasificación _____	28
1.4. Tratamiento _____	31
2. Microtúbulos como diana farmacológica _____	33
Taxanos: paclitaxel _____	34
3. Apoptosis _____	40
4. Ciclo celular _____	43
Regulación del ciclo celular _____	44
5. La ligasa de ubiquina SCF^{FBXW7} _____	51
Estructura e isoformas de FBXW7 _____	51
Mecanismos de regulación _____	53
Funciones _____	55
6. Ciclina E _____	55
7. c-Myc _____	56
8. AURKA _____	57
9. PLK1 _____	57
10. MCL1 _____	58
Obatoclax _____	59
11. Transición epitelio-mesénquima (EMT) _____	60
12. EDIL3 _____	64
Funciones _____	65
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i> _____	67
HIPÓTESIS _____	69
OBJETIVOS _____	70

MATERIALES Y MÉTODOS	71
Cultivo de líneas celulares	73
Generación de la línea resistente MDA-MB-468R	73
Tripsinización	73
Congelación y descongelación de células	73
Tratamiento con fármacos	74
Ensayos de citotoxicidad	75
ARN de interferencia (siRNA)	75
Plásmidos utilizados	75
Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i>	76
Anticuerpos utilizados para <i>Western blot</i>	77
Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo	79
Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	79
Muestras y datos de pacientes	80
Inmunohistoquímica	80
Análisis estadístico	81
Estudio comparativo de los perfiles de expresión	81
PCR cuantitativa (qPCR)	83
Ensayo ELISA para EDIL3	84
RESULTADOS	85
RESULTADO II. Bloqueo farmacológico de MCL1 como estrategia terapéutica en la sensibilización a paclitaxel	87
2.1. La administración de obatoclax revierte la resistencia a paclitaxel	87
2.2. Análisis de ciclo celular	89
2.3. Análisis de ploidía	91
RESULTADO III. Influencia de EDIL3 en la EMT y en la resistencia a paclitaxel	93
3.1. Análisis de expresión diferencial con <i>microarray</i> de <i>Affymetrix</i>	93
3.2. Confirmación de <i>microarrays</i> mediante qPCR	98

3.3. Análisis de la expresión de EDIL3 y estudio del fenotipo epitelio- mesenquimal de células de cáncer de mama	99
3.4. Silenciamiento de EDIL3 en la línea MDA-MB-231	101
3.5. Análisis de los niveles de EDIL3 secretado	102
3.6. Sensibilización de la línea MDA-MB-231 mediante tratamiento con cilengitide	104
<i>DISCUSIÓN</i>	107
<i>CONCLUSIONS/CONCLUSIONES</i>	119
CONCLUSIONS	121
CONCLUSIONES	123
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	125
<i>ANEXOS</i>	147
ANEXO I. RECETAS	149
ANEXO II. GENES	151
ANEXO III. PUBLICACIONES	153

ABSTRACT/RESUMEN

ABSTRACT

Taxanes are established in the treatment of metastatic breast cancer and early breast cancer as potent chemotherapy agents. However, their therapeutic usefulness is limited by de-novo refractoriness or acquired resistance. Despite all efforts, the mechanisms of resistance have not yet been fully understood. The aim of this thesis was to find new predictive markers of recurrence in breast cancer and new predictive markers of response to taxanes treatments

We investigated the role of FBXW7 and their substrates MCL1 and PLK1 in regulating the apoptotic response to paclitaxel treatment in breast cancer cells and their expression in breast cancer tissues. FBXW7 is a component of SCF (complex of SKP1, CUL1 and F-box-protein)-type ubiquitin ligases that targets several oncoproteins for ubiquitination and degradation by the proteasome. FBXW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitination. Recently, we identified PLK1 as a new substrate of FBXW7 modulating the intra-S-phase DNA-damage checkpoint. Paclitaxel-sensitive MDA-MB-468 and a paclitaxel-resistant MDA-MB-468R subclone were used to study the role of FBXW7 and substrates in paclitaxel-induced apoptosis. Our results showed that forced expression of FBXW7 or downregulation of MCL1 or PLK1 restored sensitivity to paclitaxel in MDA-MB-468R cells. By contrary, FBXW7-silenced MDA-MB-468 cells became resistant to paclitaxel. The expression of FBXW7 and substrates were studied in 296 invasive carcinomas by immunohistochemistry and disease-free survival was analyzed in a subset of patients treated with paclitaxel. In breast cancer tissues, loss of FBXW7 correlated with adverse prognosis markers and loss of FBXW7 and MCL1 or PLK1 accumulation were associated with diminished disease-free survival in paclitaxel-treated patients. According to our results FBXW7, MCL1 and PLK1 may be relevant predictive markers of tumor progression and response to paclitaxel treatment. Also we demonstrated that FBXW7 regulates the response to paclitaxel by targeting MCL1 and PLK1 in breast cancer cells and thus targeting these substrates may be a valuable adjunct for paclitaxel treatment. Herein, due the importance of MCL1 in mitotic cell death we used obatoclax in combination with paclitaxel as a mechanism of sensitization to antimitotic drugs in breast cancer MDA-MB-231 cells. We also highlight the importance of the order of the administration of both drugs and its effect on the response to these treatments. Our results showed that the administration of obatoclax enables to restore the sensitivity to paclitaxel in MDA-MB-231 cells.

Finally, we analyzed the epithelial–mesenchymal transition (EMT) as a mechanism which is involved in the development of acquired resistance to

paclitaxel in breast cancer. EMT is a a complex process by which epithelial cells transit to mesenchymal phenotype in order to acquire enhanced migratory capacity, invasiveness, increased resistance to apoptosis and production of extracellular matrix components. Herein, we studied the role of EDIL3, a $\alpha v\beta 3$ integrin ligand, as a novel regulator of EMT which contributes to paclitaxel resistance in breast cancer cells. The analysis of the whole genome expression profiles of breast cancer cells allowed us to identify that EDIL3 and mesenchymal markers were highly expressed in paclitaxel resistant MDA-MB-468R. Silencing EDIL3 gene decreased mesenchymal markers and restored sensitivity to paclitaxel in MDA-MB-231 cells. Disrupting the ligation of EDIL3 to integrins via RGD-blocking by cilengitide showed that EDIL3 is abundantly secreted by paclitaxel resistant MDA-MB-468R and MDA-MB-231. The administration of cilengitide in combination with paclitaxel resulted in the increased of sensitivity to paclitaxel in MDA-MB-231 breast cancer cells. Our findings demonstrated that EDIL3 may be contribute to the development of paclitaxel resistance and the administration of paclitaxel combined with cilengitide as a new and effective therapeutic strategy for the treatment of breast cancer.

RESUMEN

Los taxanos se utilizan en el tratamiento del cáncer de mama metastásico y en las etapas tempranas de la enfermedad como potentes agentes quimioterápicos. Sin embargo, su utilidad terapéutica está limitada debido al desarrollo de resistencias *de novo* o adquiridas. A pesar de todos los esfuerzos, los mecanismos de resistencia no se conocen completamente. El objetivo de esta tesis es encontrar nuevos marcadores predictivos de recurrencia en cáncer de mama y de respuesta al tratamiento con taxanos.

Hemos investigado el papel de FBXW7 y de sus sustratos MCL1 y PLK1 en la regulación de la respuesta apoptótica en el tratamiento con paclitaxel en células tumorales de mama así como su expresión en carcinomas de mama. FBXW7 es un componente del complejo de ubiquitina ligasa SCF (SKP1, CUL1 y F-box) que se encarga de ubiquitinar a numerosas oncoproteínas para su degradación por el proteasoma. FBXW7 regula la apoptosis celular mediante la ubiquitinación de MCL1. Recientemente, hemos identificado que PLK1 es un nuevo sustrato de FBXW7 que modula el punto de control del daño al ADN en la fase S. Hemos utilizado las células sensibles a paclitaxel MDA-MB-468 y resistentes a paclitaxel MDA-MB-468R para estudiar el papel de FBXW7 y sus sustratos en la apoptosis inducida por paclitaxel. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de FBXW7 o el silenciamiento de MCL1 o PLK1 restablecen la sensibilidad a paclitaxel en las células MDA-MB-468R. Por el contrario, las células MDA-MB-468 silenciadas para FBXW7 se convierten en resistentes a paclitaxel. Asimismo, estudiamos la expresión de FBXW7 y sus sustratos mediante inmunohistoquímica en 296 carcinomas invasivos y analizamos el tiempo libre de enfermedad en un subconjunto de pacientes tratados con paclitaxel. En los tejidos de cáncer de mama, la pérdida de FBXW7 correlacionó con marcadores de pronóstico adverso y la pérdida de FBXW7 y la acumulación de MCL1 o PLK1 se asoció con disminución del tiempo libre de enfermedad en los pacientes tratados con paclitaxel. De acuerdo con nuestros resultados, FBXW7, MCL1 y PLK1 podrían ser marcadores predictivos relevantes de la progresión tumoral y la respuesta al tratamiento con paclitaxel. Además demostramos que FBXW7 regula la respuesta a paclitaxel a través del control de MCL1 y PLK1 en células de cáncer de mama y por lo tanto estos sustratos podrían tener un valor añadido como dianas farmacológicas en el tratamiento con paclitaxel. En este sentido, dada la importancia de MCL1 en la muerte celular en mitosis hemos analizado el tratamiento de obatoclax en combinación con paclitaxel como mecanismo de sensibilización a fármacos antimitóticos en las células MDA-MB-231. Además resaltamos la importancia del orden en la administración de ambos fármacos y su efecto en la respuesta al tratamiento. Nuestros resultados demuestran que la

administración de obatoclax permite restablecer la sensibilidad al tratamiento con paclitaxel en las células MDA-MB-231.

Finalmente, hemos analizado el fenómeno de transición epitelio-mesénquima (EMT) como un mecanismo involucrado en el desarrollo de la resistencia adquirida a paclitaxel en cáncer de mama. EMT es un proceso complejo en el que las células epiteliales cambian a un fenotipo mesenquimal para adquirir mayor capacidad migratoria, invasividad, incremento de la resistencia a apoptosis y producción de componentes de la matriz extracelular. En este contexto, hemos estudiado el papel de EDIL3, un ligando de integrina $\alpha\beta 3$, como un novedoso regulador de EMT que contribuye a la resistencia a paclitaxel en células tumorales de mama. El análisis de la expresión génica en células de cáncer de mama nos ha permitido identificar que EDIL3 y marcadores mesenquimales se encontraban sobreexpresados en las células resistentes a paclitaxel MDA-MB-468R. El silenciamiento de EDIL3 disminuyó la expresión de marcadores mesenquimales y restableció la sensibilidad a paclitaxel en las células MDA-MB-231. La perturbación de la unión de EDIL3 a la integrina mediante el bloqueo del motivo de unión a integrina RGD a través de la administración de cilengitide mostró que EDIL3 se secretaba de manera más abundante en las células resistentes a paclitaxel. La administración de cilengitide en combinación con paclitaxel resultó en un incremento de la sensibilidad a paclitaxel en las células MDA-MB-231. Nuestros hallazgos demostraron que EDIL3 podría contribuir al desarrollo de resistencia a paclitaxel y que la administración de paclitaxel en combinación con cilengitide podría suponer una estrategia terapéutica efectiva en el tratamiento de cáncer de mama.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AJCC		<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC/C	Complejo promotor de la anafase o ciclosoma	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
APS	Persulfato amónico	<i>Amonium Persulfate</i>
AURKA	Aurora quinasa A	
CDC20		<i>Cell-division cycle 20</i>
CDK	Quinasa dependiente de ciclinas	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CFM	Ciclofosfamida	
CGT	Cilengitide	
CK5/6	Citoquina 5/6	
CKIs	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina	
CMF	Ciclofosfamida, Metrotexato y Fluoruracilo	
CPD	Cdc4 fosfodegrón	<i>Cdc4 phospho-degron</i>
CrEL	Cremophor EL®	
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DD	Dominio de muerte	<i>Death Domain</i>
DEHP		<i>Di(2-ethylhexil) ftalato</i>
DFS	Tiempo libre de enfermedad	<i>Disease free survival</i>
DISC	Complejo señalizador de inducción de muerte	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido	
Dominio BH	Dominio de homología con Bcl-2	<i>Bcl-2 homology domain</i>
DUB	Desubiquitinasa	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMC	Matriz extracelular	<i>Extracelullar mastrx</i>

Abreviaturas y acrónimos

EMT	Transición epitelio-mesénquima	<i>epithelial–mesenchymal transition</i>
FBS	Suero fetal bovino	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR		<i>False Discovery Rates</i>
FEC	5-Fluoruracilo, epirrubicina y ciclofosfamida	
FECP	FEC más paclitaxel	
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
FTN	Fenotipo triple negativo	
GEICAM	Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama	
gp-P	glicoproteína P	
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etanosulfónico	
HER2	Receptor de factor del crecimiento epidérmico humano 2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
IARC		<i>International Agency for Research on Cancer</i>
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos	
MCL1	Proteína de la leucemia de células mieloides 1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
NP-40	Nonidet P-40	
OBT	Obatoclax	
PARP	Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa	
PBS	Tampón fosfato salino	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PLK1	Polo quinasa 1	<i>Polo- like kinase1</i>
PTTG1	Gen transformante de tumores pituitarios	<i>Pituitary Tumor Transforming Gene</i>
qPCR	PCR cuantitativa	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RE	Receptor de estrógenos	
RGD	Tripéptido formado por Arg-Gly-Asp	<i>Arginylglycylaspartic acid</i>
RP	Receptor de progesterona	
SAC	Punto de control del ensamblaje del huso	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
SCF	Skp1-Cul1-F-box	

Abreviaturas y acrónimos

SDC2	Sindecano 2	<i>Syndecan-2</i>
SDS	Dodecil sulfato	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ser	Serina	
SFC	Spk1/Cul1/proteína F-box	
siRNA	RNA pequeño de interferencia	<i>Small Interfering RNA</i>
SKP2		<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SSC	Citrato sódico salino	<i>Saline Sodium Citrate</i>
TBS	Tampón tris salino	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N-tetraetilendiamina	
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
Thr	Treonina	
TNF	Factor de necrosis tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TNM	Tumor-nódulo-metástasis	<i>Tumor-node-metastasis</i>
Ub	Ubiquitina	
UBA	Asociado a ubiquitina	<i>Ub-associated</i>
Wnt	Sitio de integración relacionado con "Wingless"	<i>Wingless-related integration site</i>

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de mama

En la actualidad el cáncer representa una de las enfermedades con mayor incidencia, prevalencia y mortalidad a nivel mundial. El cáncer de mama continúa siendo la neoplasia más común entre las mujeres y suponen la segunda causa de mortalidad debido a cáncer en el mundo. Esta neoplasia está considerada como un conjunto de diversas enfermedades que se originan en la glándula mamaria y tienen la capacidad de invadir tejidos circundantes y propagarse a órganos alejados e implantarse en ellos. Se trata por tanto de una compleja entidad que provoca que los tumores de mama muestren características moleculares, fisiológicas y morfológicas diferentes y por tanto, respuestas dispares a la terapia sistémica^{1,2}. La diversidad de estos tumores genera un reto hacia la búsqueda de nuevos marcadores que permitan una clasificación clínica que facilite el pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento y, por tanto, fomenten la posibilidad de terapias cada vez más individualizadas³.

A pesar de que en las últimas décadas el conocimiento del proceso de tumorigénesis ha ido aumentando, el desconocimiento parcial de la biología del cáncer constituye hoy en día la mayor barrera para el diseño de nuevas terapias. Atendiendo a la definición de «Cáncer» como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, en las últimas décadas las investigaciones han tratado de identificar características comunes de las células cancerosas. Dentro de ese marco, en el año 2000 los científicos Douglas Hanahan y Robert Weinberg, publicaron seis características distintivas del cáncer y once años más tarde estos mismos autores identificaron dos nuevas señas de identidad de las células cancerosas^{4,5} (figura 1).

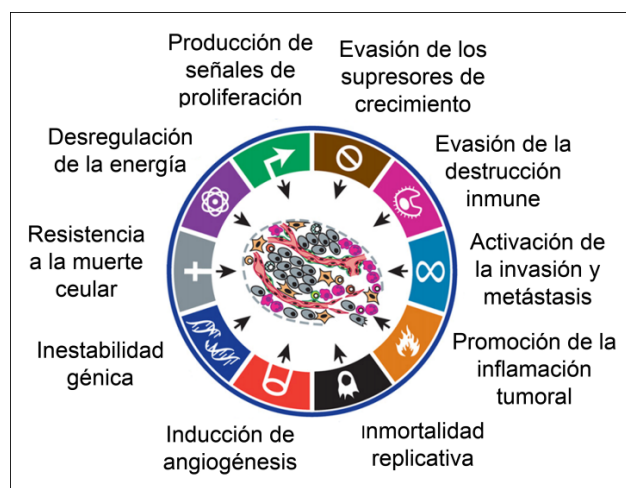


Figura 1. Características comunes adquiridas del cáncer. Adaptado de D. Hanahan and R. Weinberg., 2000 y 2011)^{4,5}.

Partiendo de los supuestos anteriores no resulta sorprendente que el cáncer de mama suele ir acompañado de la adquisición de estrategias celulares que se traduzcan en la aparición de metástasis y permita la formación de nuevos focos tumorales en órganos diferentes donde continúa su expansión⁶. Además, los defectos en las vías de señalización de apoptosis también son frecuentes en las células tumorales de mama, y del cáncer en general, y el desequilibrio que producen estas alteraciones al aumentar la supervivencia celular juega un papel importante tanto en la progresión tumoral, como en la respuesta a la quimioterapia⁷. Por tanto, la comprensión de las bases moleculares de las vías de señalización implicadas en la transformación maligna y en la capacidad de formación de nuevos focos tumorales conducirá no sólo a nuevos avances en el conocimiento de la biología del cáncer de mama, sino también a nuevas y más eficaces terapias contra los tumores.

1.1. Epidemiología

La incidencia del cáncer de mama ha ido aumentando de manera ininterrumpida desde 1940 con un incremento anual del 1-4%⁸. La implantación de los programas de cribado poblacional supuso que esta tendencia ascendente fuera aún más pronunciada en la década de 1990⁹. Afortunadamente, desde hace algunos años, la tasa de mortalidad en cáncer de mama sigue una tendencia decreciente asociada tanto a la detección precoz de la enfermedad como a la optimización de los tratamientos. A pesar de ello, según datos del proyecto GLOBOCAN desarrollado en el seno de la IARC (de inglés *International Agency for Research on Cancer*) en 2012 se diagnosticaron 25.215 casos nuevos en España, 458.718 en Europa y 1.670.000 en todo el mundo¹⁰. La población masculina representa el 1% de los casos y fallecimientos por esta causa.

1.2. Factores pronósticos y predictivos

Aunque se desconocen las causas exactas del cáncer de mama la investigación muestra que mujeres con ciertos factores de riesgo tienen mayor probabilidad de padecerlo. Entre estos factores se encuentran: una edad superior a 50 años, alteraciones en la mama, exposición a estrógenos, antecedentes familiares y alteraciones genéticas asociadas principalmente a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2.

Establecer el pronóstico y seleccionar el mejor tratamiento para cada paciente constituye un paso clave para la curación de esta neoplasia. Así, mientras que los factores pronósticos informan del riesgo de recidiva, los factores predictivos ayudan en la selección de la terapia más efectiva para reducir este riesgo. En este sentido, el tamaño tumoral se considera un factor pronóstico y correlaciona de manera directa con la supervivencia del

paciente y con la afectación ganglionar. Se ha establecido que el riesgo relativo de presentar compromiso ganglionar es del 20% en tumores menores de 10 mm, del 30% en tumores de 10 a 20 mm, y del 70% para los mayores de 50 mm¹¹. Dado que una de las principales vía de diseminación de las células cancerosas es la linfática cuando los ganglios se encuentran afectados se considera que la enfermedad es de peor pronóstico.

Por su parte, establecer el estado de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y HER2/neu es fundamental para predecir la respuesta a la terapia endocrina y dirigida al HER2. En la actividad clínica habitual el estado de los receptores hormonales se realiza mediante técnicas de inmunohistoquímica y el estado HER2 por inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Finalmente, la determinación del grado histológico se utiliza como indicador de la agresividad, es decir, la rapidez con la que probablemente crecerá y se extenderá el tumor. El grado de un tumor es una descripción del tumor basado en la forma que muestran las células y los tejidos vistas al microscopio. En la práctica clínica se utiliza el sistema de Nottingham, llamado también modificación de Elston-Ellis del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson¹². Este sistema asigna un grado a los tumores en función de la formación tubular (cantidad de tejido que tiene estructura normal de conductos galactóforos), el grado nuclear (evalúa el tamaño y forma del núcleo de las células tumorales) y el rango mitótico (estima la rapidez con la que las células se dividen). A cada una de las categorías se le asigna un valor del 1 al 3; así una puntuación de 1 indica que las células tumorales se asemejan a las células del tejido normal, y una puntuación de 3 indica que las células tumorales y las células del tejido normal son muy diferentes. En base a esto, los tumores obtienen una calificación de entre 3 y 9 puntos y se clasifican como grado 1, 2 ó 3 (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del grado en cáncer de mama de acuerdo con el sistema de Nottingham

Grado	Diferenciación	Puntuación final
1	Alta	3-5
2	Moderada	6-7
3	Baja	8-9

1.3. Clasificación

Clasificación histológica

El subtipo histológico viene determinado por las células de las que deriva el tumor¹³. Según las características estructurales y el lugar de origen, el cáncer de mama se puede clasificar en los subtipos: lobular, pezón, ductal y otros (figura 2).

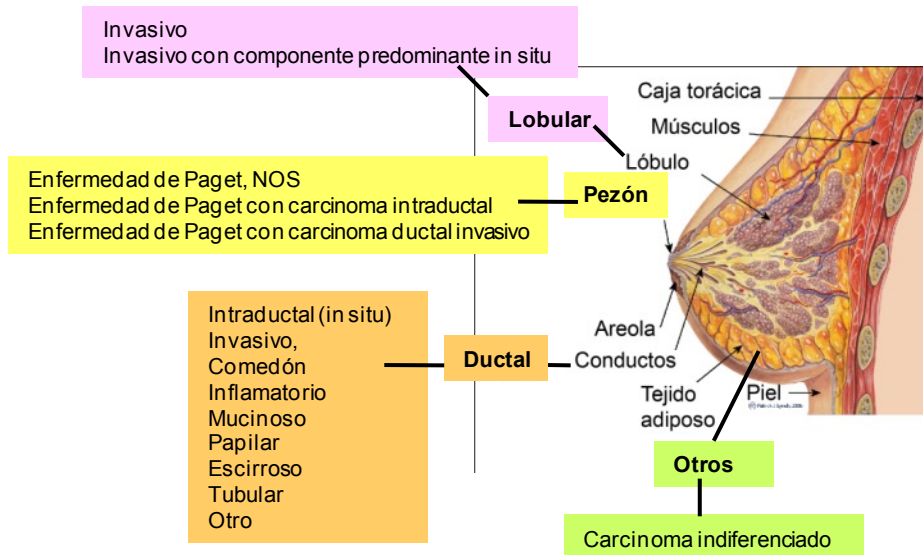


Figura 2. Estructura anatómica de la glándula mamaria y subtipos histológicos del cáncer de mama. Adaptado de Pourteimoor V. et al, 2016¹³.

Clasificación molecular

La evidencia acumulada en el cáncer de mama muestra que pacientes con características similares pueden presentar respuestas muy heterogéneas frente a los tratamientos administrados. Esto se debe a la asociación entre la historia natural del cáncer de mama en cada paciente y el perfil de expresión genética del tumor. Los investigadores Perou y Sorlie desarrollaron uno de los primeros modelos de clasificación basado en el patrón de genes que codifican para RE, RP, HER2, HER1 y citoqueratina 5/6 (CK5/6). Según la expresión de estos cinco genes se pudo clasificar el cáncer de mama en cinco subtipos: luminal A, luminal B, Her2 positivo, basal y normal¹⁴⁻¹⁶.

El fenotipo luminal se caracteriza por una alta expresión de receptores estrogénicos y de genes regulados por estrógenos, lo que proporciona una

alta tasa de respuesta a la hormonoterapia, por lo que se asocia a un mejor pronóstico. Dentro de este subtipo se puede diferenciar:

- **Luminal A:** representa más del 50% de los cánceres de mama¹⁷. Suele tener un grado histológico bajo y el pronóstico más favorable de todos, con una supervivencia a los 5 años mayor del 80%¹⁵.
- **Luminal B:** su tasa de supervivencia a los 5 años es del 40%¹⁵.

El subtipo Her-2 positivo presenta el genotipo de RE negativos y se asocia con la sobreexpresión de genes relacionados con características más agresivas, lo que conlleva un peor pronóstico. Supone el 15-30% del total de los carcinomas de mama y son tumores de grado intermedio o alto, con un curso clínico agresivo, supervivencia a los 5 años del 31% y con alta probabilidad de recidiva¹⁵. Este subtipo presenta una resistencia relativa a determinados agentes quimioterápicos, como el esquema clásico CMF (Ciclofosfamida, Metrotexato y Fluoruracilo) y al tamoxifeno. Sin embargo, su historia natural ha sufrido un cambio con la introducción en el mercado de anticuerpos monoclonales anti-HER-2, como trastuzumab.

El subtipo Basal (“*basal-like*”) también es conocido como triple negativo (FTN), puesto que suele presentar negatividad para los receptores RE, RP y HER-2. Oscila entre el 12-17% de los cánceres mamarios y es más frecuente en mujeres jóvenes de raza negra y en portadoras de mutación en el gen BRCA1¹⁸. En un 50% de los casos los carcinomas de mama con fenotipo basal presentan una sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y generalmente se asocian con hallazgos histopatológicos de mal pronóstico como alto grado nuclear, polimorfismo y/o un alto índice mitótico. Por tanto, se trata de un subtipo de cáncer de mama de mal pronóstico, pero que paradójicamente se asocia a una alta tasa de respuesta a la quimioterapia¹⁹.

El subtipo normal comparte características del tejido mamario normal, sin embargo muestra una fuerte expresión de genes normalmente expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales¹³.

A pesar de que esta clasificación ha sufrido modificaciones en los últimos años con la aparición de nuevos subgrupos, en la actualidad parece que el modelo basado en los patrones de expresión génica que mejor clasifica los distintos subtipos de cáncer de mama es el basado en 6 biomarcadores: RE, RP, HER2, ki67, CK5/6 y EGFR^{2,20}(tabla 2).

Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.

		RE	RP	HER2	CK5/6 EGFR	Ki67	Grado	Mutaciones TP53
ER-	Normal like	+/-	*	-	+	Bajo	Bajo	Bajo
	HER2+/ER-	-	-	+	+/-	Alto	Alto	Alto
	Basal like	-	-	-	+	Alto	Alto	Alto
	Interferon	Alta expresión de genes relacionados con interferon Genes de respuesta inmune: baja						
	Claudin-low	-	-	-	+/-	Alto	Alto	Alto
	Molecular apocrine	-	-	+/-	+/-	Alto	Intermedio /alto	Intermedio /alto
ER+	Luminal A	-	+	-	-	Bajo	Bajo	Bajo
	Luminal B	+/-	+/-	+/-	-	Alto	Intermedio /alto	Intermedio

RE: receptor de estrógenos; RP: receptor de progesterona, CK5/6: citoqueratinas 5 y 6; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; +: positivo; -: negativo. Modificado de Eroles P et al., 2012.

A día de hoy, el análisis génico pueden guiar las decisiones de tratamiento de pacientes de cáncer de mama. La determinación de perfil génico se realiza mediante ensayo de micromatriz o reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa como por ejemplo las pruebas MammaPrint y Oncotype DX. .

Clasificación TNM

Con el objetivo de proporcionar una estrategia que permitiera agrupar a los pacientes en función de su pronóstico el AJCC (del inglés *American Joint Comitee on Cancer* propuso la estadificación del cáncer de mama mediante la clasificación tumor-nódulo-metástasis (TNM). Este sistema se modificó en 2002 y clasifica algunas categorías ganglionares que previamente se consideraba que correspondía el estadio II, como estadio III²¹. La clasificación refleja tres aspectos: tumor primario (T), afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y existencia no de metástasis a distancia (M) (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación TNM del cáncer de mama. Adaptado de 6ª edición del AJCC

TAMAÑO	NÓDULOS	METÁSTASIS	Estadio 0
T1 <2 cm	N0 Ganglios auxiliares no palpables	M0 Ausencia de metástasis	Tis N0 M0 Estadio I T1 N0 M0
T2 2-5 cm	N1 Ganglios auxiliares móviles del lado del tumor	M1 Metástasis a distancia	Estadio II A T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0 Estadio II B T2 N1 M0 T3 N0 M0
T3 >5 cm	N2 Ganglios auxiliares fijos en ausencia de metástasis	Mx No se pueden evaluar las metástasis	Estadio III A T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
T4 Cualquier tamaño que se extienda a la pared torácica	N3 Metástasis a ganglios supra e infraclaviculares		Estadio III B T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0 Estadio III C Cualquier T, N3 M0 Estadio IV Cualquier T, cualquier N, M1

T: tamaño, N: nódulos, M: metástasis

1.4.Tratamiento

Las decisiones terapéuticas se formulan de acuerdo con diversos factores relacionados tanto con la propia paciente como con la enfermedad. Así, se tienen en cuenta las categorías de estadificación, los índices RE/RP en el tejido tumoral, la sobreexpresión de HER2, el estado menopáusico y la salud general del paciente. A la mayoría de las pacientes se les practica algún tipo de cirugía que, a menudo, se combina con radioterapia y/o quimioterapia²².

Cirugía

El objetivo principal de la cirugía es, por un lado eliminar el tumor y, por otro, permitir la estadificación de la enfermedad. En la actualidad se distinguen dos grupos de técnicas según el grado de agresividad siendo la relación entre el tamaño del tumor y la mama determinante para decantarse por una u otra.

Cirugía conservadora: implica la extirpación del tumor junto con una pequeña cantidad de tejido sano circundante.

Mastectomía: implica la extirpación completa de la glándula mamaria.

Radioterapia

Actualmente la radiación se utiliza para destruir las células cancerosas que permanecen en el organismo tras la cirugía o para reducir el tamaño del tumor antes de la misma²². Se distinguen dos tipos principales de radioterapia:

Radioterapia de haz externo: utiliza un equipo denominado acelerador lineal que envía radiación hacia el área donde se localiza el tumor. Es el tipo de radiación más habitual.

Radioterapia interna o braquiterapia: implica la colocación de la fuente de radiación muy cerca o dentro del tumor.

Tratamiento sistémico

El tratamiento sistémico, a diferencia de la cirugía o radioterapia, actúa sobre todo el organismo. Según la finalidad con la que se administran, los tratamientos sistémicos se clasifican en dos tipos²²:

Neoadyuvancia: es un tratamiento pre-quirúrgico que se utiliza para reducir el tamaño tumoral con objeto de hacer viable la cirugía o en tumores operables en los que aunque se indican mastectomía la paciente desea someterse a una técnica conservadora.

Adyuvancia: es el tratamiento que se administra después de la cirugía para disminuir la probabilidad de recidiva local o sistémica y aumentar la supervivencia.

Sin duda el tratamiento sistémico constituye uno de los pilares fundamentales en la terapia integral del cáncer de mama. Los avances producidos en el conocimiento de la biología de estas neoplasias se han traducido en un incremento de la individualización del tratamiento. De modo que aunque existen numerosas alternativas para el tratamiento sistémico, éste se puede clasificar en tres grandes grupos de terapias:

Hormonoterapia (terapia hormonal): está indicado en el tratamiento de tumores positivos para receptores hormonales, y habitualmente se administra tras finalizar la quimioterapia. El beneficio se consigue al impedir la proliferación celular mediante la eliminación de la fuente estrogénica (inhibidores de la aromataasa), el bloqueo de la unión del estrógeno con el receptor (moduladores selectivos de los receptores de estrógeno) o con agentes antiestrogénicos (antagonistas del receptor de estrógenos)²³. El Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) recomienda tamoxifeno, un modulador selectivo de receptores de estrógeno, en monoterapia o combinado con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina en mujeres premenopáusicas, mientras que en mujeres posmenopáusicas se recomienda el uso de inhibidores de la aromataasa²⁴.

Terapias biológicas: utiliza sustancias procedentes organismos vivos para estimular o inhibir el sistema inmune o bien actuar sobre dianas moleculares específicas de las células cancerosas. Actualmente, se utiliza para el tratamiento de los cánceres de mama que sobreexpresan la proteína HER2/neu ya estos tumores tienden a un crecimiento más rápido y presentan

mayor probabilidad de reparación. Para su tratamiento se utilizan anticuerpos monoclonales como tratuzumab que mejora la supervivencia de algunos pacientes con tumor metastásico²⁵.

Quimioterapia: implica el uso de fármacos para tratar todos los estadios del cáncer de mama, incluso la recurrencia en el área de la mama y la enfermedad metastásica. La vía común por la que los quimioterápicos ejercen su efecto citotóxico en las células es mediante la inducción de apoptosis en respuesta a la aparición de daños celulares irreparables. Este efecto puede lograrse por ejemplo actuando a nivel del ADN o ARN como las antraciclinas, ciclofosfamida o 5-fluoruracilo o de la dinámica de los microtúbulos como los agentes antimitóticos²³.

2. Microtúbulos como diana farmacológica

Los microtúbulos son estructuras proteicas que forman parte esencial del citoesqueleto celular. Entre sus funciones destaca su importancia en la división celular ya que dirigen el posicionamiento correcto de los cromosomas durante la mitosis²⁶. Su componente principal es una proteína de 100 kDa denominada tubulina cuya secuencia se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas. La molécula de tubulina está compuesta por dos monómeros, α y β , que comparten aproximadamente el 40% de identidad de secuencia y cuyas estructuras tridimensionales son muy similares.

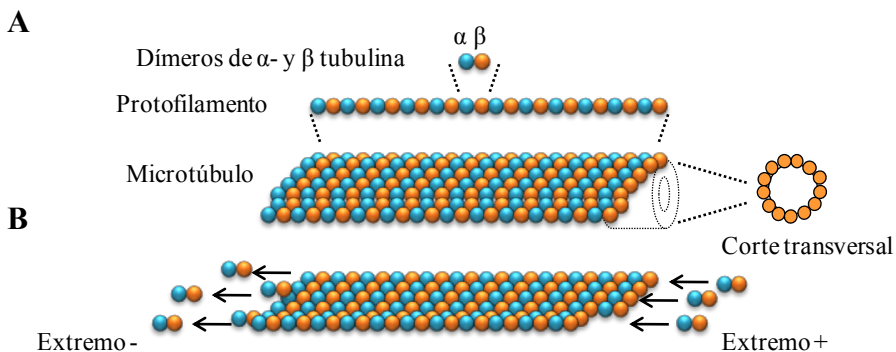


Figura 3. Estructura de los microtúbulos. (A) Las suunidades de α -tubulina (azul) y β - tubulina (naranja) forman heterodímeros que interaccionan para formar protofilamentos. Los protofilamentos se asocian lateralmente dando lugar a la pared cilíndrica del microtúbulo. (B) Representación del extremo negativo del microtúbulo (extremo de despolimerización) y del extremo positivo del microtúbulo (extremo de polimerización) delimitados por α -tubulina y β -tubulina, respectivamente. Adaptado de Stanton et al, 2011²⁶.

Los dimeros de tubulina interaccionan cabeza con cola para formar protofilamentos rectos que se asocian de forma paralela formando los microtúbulos, unas estructuras de 25 nm de diámetro y longitud variable. La organización de los protofilamentos dentro del microtúbulo provoca que éste

tenga una polaridad diferente en cada uno de sus extremos, es decir, en cada microtúbulo existe un extremo positivo compuesto por β -tubulina y un extremo negativo compuesto por α -tubulina. Los heterodímeros de tubulina se añaden con mayor afinidad a la α -tubulina, por lo que el extremo positivo de los microtúbulos es, preferentemente, el extremo de crecimiento del microtúbulo y en él predomina la polimerización, mientras que en el extremo negativo predomina la despolimerización (figura 3). La incorporación de nuevos dímeros de tubulina hace que el microtúbulo crezca en longitud, sin embargo este proceso puede detenerse e incluso revertirse. La alternancia entre polimerización y despolimerización se denomina inestabilidad dinámica y es un fenómeno dependiente del aporte continuo de energía que procede de la hidrólisis de GTP. Estas propiedades dinámicas son cruciales en la división celular, y cualquier interferencia en su proceso perturba el desarrollo de la división y causa la muerte celular por apoptosis. Por ello, dado el papel crítico de los microtúbulos en la división celular, la tubulina se presenta como una diana importante en el desarrollo de fármacos quimioterápicos²⁷.

Los fármacos dirigidos a microtúbulos se han clasificado convencionalmente en dos grandes grupos:

Desestabilizadores de microtúbulos, como los alcaloides de la Vinca, que inhiben la polimerización de los microtúbulos y los desestabiliza.

Estabilizadores de microtúbulos, como los taxanos y las epotilonas, que promueven la polimerización de los microtúbulos estabilizándolos^{28,29}.

Taxanos: paclitaxel

Los taxanos, como paclitaxel y docetaxel, son unos de los agentes citotóxicos más activos y ampliamente utilizados en el tratamiento de cáncer de mama avanzado.

Paclitaxel fue identificado y extraído inicialmente a partir de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). En 1991 la empresa farmacéutica Bristol-Myers Squibb se hizo cargo su desarrollo y comercialización bajo el nombre de *Taxol*®. Actualmente su uso está recomendado en el tratamiento de diferentes tumores sólidos como en mama, pulmón u ovario entre otros, debido a su capacidad de inhibir la proliferación de las células tumorales.

Mecanismo de acción

Este agente antimetabólico se une tanto a la región N-terminal de la unidad de β -tubulina como a la región formada por los aminoácidos 217-231, favoreciendo así la formación de largos polímeros, incluso en presencia de GDP, que no podrán acortarse. El microtúbulo estabilizado con paclitaxel

posee 12 protofilamentos (en lugar de los 13 protofilamentos normales) y un diámetro inferior al normal³⁰.

Dado que el sistema de microtúbulos integra componentes mecánicos tanto para el ciclo celular como para la apoptosis no resulta sorprendente que paclitaxel tenga efectos en la modulación del ciclo y en la inducción de apoptosis³¹, por lo que la correcta interacción entre ambos mecanismos es esencial en la respuesta de las células a los taxanos.

Antes de comentar a explicar los efectos de paclitaxel en el ciclo celular resulta interesante mencionar, que el ciclo de una célula normal está controlado por unos puntos de control que regulan el paso entre las distintas fases. Entre ellos se encuentra el punto de control de ensamblaje del huso o SAC, que impide la entrada en anafase hasta que los cromosomas estén correctamente unidos al huso mitótico a través de los cinetocoros. Durante la fase G2 se expresan las ciclinas A y B, que dan lugar a la formación del complejo ciclina A/B-CDK1. La activación de este complejo dirige la mitosis hacia la metafase, sin embargo el avance hacia las fases posteriores requiere la degradación de sustratos como ciclina B1 y PTTG1 que conducirá a la pérdida de cohesión entre cromátidas hermanas³². Para que este evento suceda, el complejo promotor de la anafase (APC/C) unido a CDC20, su principal co-activador durante la mitosis, es el responsable de ubiquitinar a ciclina B1 y a PTTG1 para su posterior degradación. A su vez, el APC/C está controlado por el SAC, de manera que cuando el SAC se encuentra activo, varias proteínas que forman parte del complejo, como BubR1, secuestran a CDC20. La función ubiquitina ligasa del APC/C queda entonces inhibida y no se produce la segregación de los cromosomas. De manera que sólo cuando el SAC queda satisfecho por la correcta alineación de los cromosomas en la placa metafásica y se inactiva, el APC/C^{CDC20} media la degradación de ciclina B1 y PTTG1 y el ciclo celular progresa a anafase y posterior salida de mitosis³³ (figura 4).

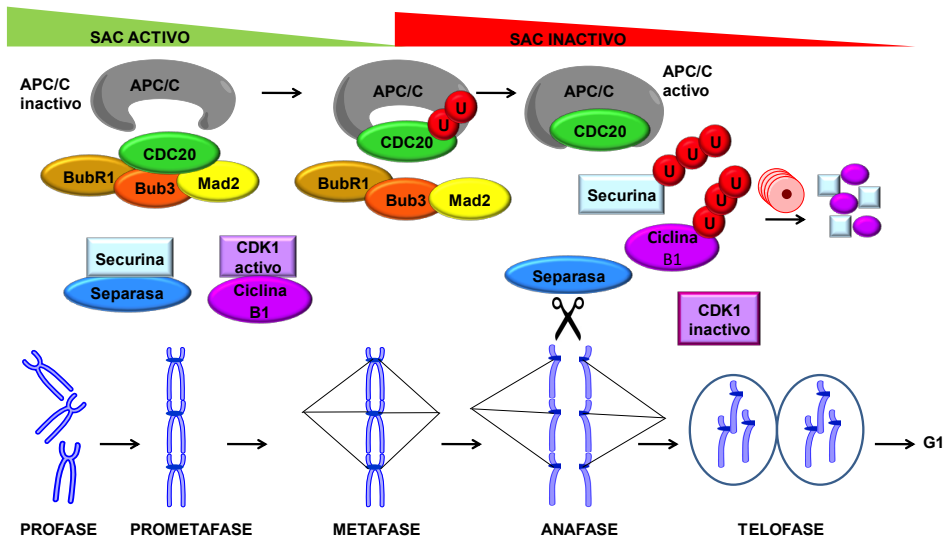


Figura 4. Actividad del SAC durante la mitosis. El SAC, formado por componentes como BubR1, Mad2 o Bub3, se mantiene activo hasta que los cinetocoros de los cromosomas se unen adecuadamente al huso mitótico. CDC20, el factor activador de APC/C, es liberado y reclutado por el APC/C lo que provoca la inactivación de SAC y activación de APC/C. Este evento da lugar a la ubiquitinación de ciclina B1 y securina (PTTG1) y, a la posterior degradación de ambos sustratos por el proteasoma. La degradación de ciclina B1 y securina provoca la inactivación de Cdk1 y la activación de la separasa respectivamente y, como consecuencia, la separación de las cromátidas hermanas. Finalmente tiene lugar la citocinesis y salida de la célula de mitosis. Adaptado de Musacchio & Salmon, 2007³³.

Así, la estabilidad de la dinámica de los microtúbulo provocada por paclitaxel da lugar a la activación del SAC que bloquea el funcionamiento normal del huso y provoca una parada prolongada de la célula en mitosis impidiendo la división celular. La célula queda entonces retenida en fase G2/M y muere en mitosis por apoptosis.

Sin embargo, se ha observado que en ocasiones, tras la exposición a paclitaxel, ciclina B1 es capaz de degradarse en las células cancerosas con SAC activado^{34,35}. Si los niveles de ciclina B1 disminuyen por debajo del umbral requerido para mantener el bloqueo en mitosis, la célula escapará de la parada en mitosis incluso en condiciones que mantiene el SAC activo, proceso que se denomina deslizamiento (*slippage*).

Estudios recientes han demostrado que tras una parada prolongada en mitosis inducida por la activación del SAC, las células pueden morir en mitosis, o bien, escapar de la misma mediante deslizamiento e iniciar un nuevo ciclo con doble contenido de ADN, en un estado tetraploide G1. Tras el deslizamiento las células pueden morir, parar en G1, o iniciar un nuevo ciclo celular (figura 5).

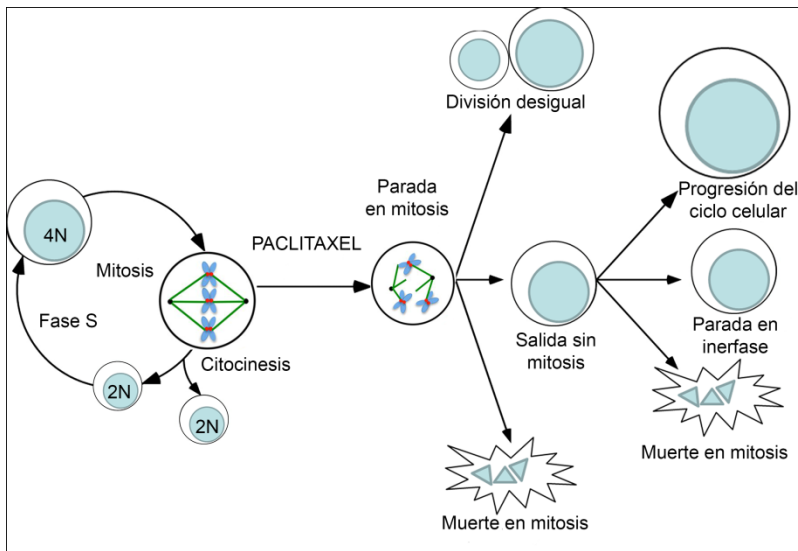


Figura 5. Respuesta celular ante el tratamiento de fármacos antimitóticos. El tratamiento con fármacos antimitóticos provoca la activación crónica del SAC y la consiguiente parada de la célula en mitosis. Posteriormente, pueden tener lugar diferentes eventos como la división celular asimétrica, la muerte celular en mitosis o la salida de mitosis mediante deslizamiento. Tras el deslizamiento, las células pueden morir, permanecer en G1 durante un tiempo indefinido o iniciar un nuevo ciclo celular. Adaptado de Gascoigne and Taylor, 2009³⁶.

Estas variaciones observadas en el comportamiento entre diferentes líneas celulares e incluso entre diferentes células del mismo cultivo reflejan que el bloqueo de la división celular previene la proliferación pero no necesariamente implica muerte celular^{34,37}. La relación entre la parada en mitosis inducida por paclitaxel y la posterior supervivencia o muerte de la célula no se conoce completamente³⁸. Se ha propuesto un modelo en el que dos redes compiten entre sí durante la parada en mitosis, una de ellas induce las rutas de muerte y la otra controla la degradación de ciclina B1 y la salida de mitosis. De modo que si lo primero que ocurre es que los niveles de ciclina B1 caen por debajo del umbral, la célula saldrá de mitosis por deslizamiento; mientras que si el umbral de muerte es el que se alcanza en primer lugar, la célula morirá durante la parada en mitosis³⁶.

Uso clínico en cáncer de mama

En la actualidad, paclitaxel se utiliza en el tratamiento de cáncer de mama de pacientes nodo positivas tras quimioterapia adyuvante con antraciclinas y CFM. Su uso también está indicado en el tratamiento inicial del cáncer de mama metastásico o localmente avanzado, generalmente en combinación con antraciclinas o trastuzumab. Su administración en monoterapia sólo está indicada en cáncer metastásico con fracaso a antraciclinas.

En este sentido, la práctica clínica ha demostrado que la combinación de taxanos con antraciclinas mejora los resultados de la terapia en términos de respuesta global³⁹. Actualmente, cinco estudios aleatorizados (GALGB 9344⁴⁰, NSABP -28⁴¹, PACS 01, GEICAM 9906⁴² y MDACC 94-002⁴³ han evaluado la eficacia de los taxanos secuenciales con antraciclinas comparados con antraciclinas. La mayoría de ellos han demostrado que la adición de taxanos incrementa la supervivencia libre de enfermedad. Además, otros cuatro estudios (BCIRG001⁴⁴, E2197⁴⁵, RAPP 01⁴⁶, ECTO⁴⁷ han evaluado la utilidad de los taxanos administrados de manera concomitante con las antraciclinas, y de manera general, se recomienda el tratamiento con quimioterapia secuencial debido a que a pesar de presentar una eficacia es similar, la administración secuencial genera menor toxicidad en las pacientes. En enfermedad metastásica el estudio GALGB 9840⁴⁸ demostró que paclitaxel administrado semanalmente es más activo en términos de respuesta global y tiempo de progresión al compararlo con la administración trisemanal, sin lograr modificar la supervivencia global.

Si bien es cierto que existen evidencias que avalan el uso rutinario de taxanos en el tratamiento adyuvante de cáncer de mama ganglio positivos⁴⁹, aún existen dudas sobre el taxano a elegir y la mejor administración. Recientemente, un estudio factorial 2x2 que evaluó la utilidad de docetaxel comparado con paclitaxel adyuvante⁴⁵, y la administración semanal contra la trimestral, no encontró beneficios en la supervivencia libre de enfermedad en ninguna de sus comparaciones. A pesar de que el perfil de seguridad fue semejante, la administración trisemanal de paclitaxel se asoció con mayor neutropenia y la administración semanal incrementó la neuropatía.

Reacciones adversas

La mayoría de estos estudios apuntan a que el uso de taxanos para el tratamiento de cáncer de mama en etapas tempranas y en la enfermedad avanzada, ha supuesto mejoras significativas en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes de paclitaxel es que puede ocasionar neuropatía periférica sensorial y motora. De hecho, la neuropatía periférica es un efecto dosis dependiente y es a menudo prolongada e irreversible.

Además son frecuente reacciones de hipersensibilidad asociadas a la administración de paclitaxel. Esto es debido, principalmente, a que paclitaxel es insoluble en agua, por lo que su formulación requiere emulsificación con solventes como aceite de ricino (Cremophor EL®: CrEL) y etanol para permitir una administración intravenosa. CrEL potencia a un plastificante (DEHP) que se libera de los instrumentos intravenosos estándares que contienen policloruro de vinilo y puede provocar reacciones de

hipersensibilidad en el organismo e incluso anafilaxia. Para compensar estas respuestas adversas generalmente se administra premedicación con corticoides y antihistamínicos. Además actualmente se están desarrollando nuevos compuestos para la formulación de paclitaxel libre de CrEL como es el caso de Nab-paclitaxel (paclitaxel unido a albúmina)^{50,51}.

Mecanismos de resistencia

Otro de los eventos que limita el uso de paclitaxel en la práctica clínica habitual es la aparición de resistencia en los pacientes. Por ello, surge la necesidad, por un lado, de desarrollar nuevos esquemas de tratamiento que sean eficaces en los casos de resistencia a taxanos, y por otro lado, de encontrar biomarcadores que permitan predecir la respuesta a estos fármacos³⁹. Un mayor entendimiento de los mecanismos de resistencia a taxanos, permitirá el desarrollo y el uso eficaz de los agentes quimioterápicos que evitarán la resistencia y causará una mejora en el tratamiento del cáncer de mama.

De manera simplificada podría decirse que la resistencia ocurre antes de la exposición (resistencia *de novo* o innata) o como resultado de la exposición al fármaco (resistencia adquirida). Los estudios *in vitro* han demostrado que las células cancerosas desarrollan resistencia a paclitaxel a través de varios mecanismos relacionados por ejemplo con las proteínas encargadas de eliminar las concentraciones excesivas de sustancias tóxicas extra y/o intra celulares. Uno de los mecanismos más estudiados de resistencia a taxanos consiste en el incremento de la eliminación del fármaco como resultado del aumento de gp-P debido a la desregulación de genes MDR-1⁵².

También se han descrito mecanismos relacionados con el incremento de la expresión de la tubulina *per sé*, alteración de los perfiles de expresión de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) así como alteración en la expresión de los isotipos de tubulina. De hecho, se encuentran diferencias en la unión a paclitaxel dependiente del isotipo de la tubulina. Se ha demostrado la existencia de al menos 6 isotipos de α -tubulina y 8 isotipos de β -tubulina que se diferencian en los niveles de aminoácidos y en sus patrones de expresión. Recientemente varios estudios han ligado la sobreexpresión de la isoforma β III o de la β V a resistencia a taxanos⁵³.

Como hemos comentado anteriormente el SAC también posee un papel crítico en la muerte celular mediada por taxanos por lo que defectos en este punto de control correlacionan con resistencia a taxanos. La composición del huso mitótico, la dinámica del ensamblaje de los microtúbulos y la parada en anafase-metafase inducido por los agentes antimicrotúbulos resaltan la importancia de que la transición a fase M es decisiva en la sensibilidad al

tratamiento y de que el déficit de las proteínas que regulan el SAC podría ser suficiente para conferir resistencia a taxanos⁵³.

Asimismo estudios recientes indican que la sobreexpresión de la regulación de los miembros de la familia antiapoptóticas Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-XL y/o la disminución de los miembros proapoptóticos como Bax contribuyen a la resistencia a taxanos⁵⁴. En este sentido, la proteína antiapoptótica MCL1 juega un papel vital en la adquisición de resistencia a fármacos.

Por último, varios autores han identificado algoritmos de genes involucrados en ciclo celular, apoptosis, adhesión celular incremento de expresión de señales transcripcionales y transduccionales que correlacionan con resistencia a taxanos en cáncer de mama^{55,56}.

3. Apoptosis

La apoptosis se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte programada. Este proceso permite al organismo su correcta morfogénesis, el control de la homeostasis de los tejidos y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia⁵⁷. Por ello resulta sencillo entender la necesidad de una precisa y estricta regulación de un proceso irreversible como es este tipo de muerte celular⁵⁸. Durante el proceso apoptótico la célula sufre una serie de cambios morfológicos como son la alteración de la membrana plasmática de la que surgen unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas (*blebbing*), reducción del volumen celular y nuclear, condensación de la cromatina y de diversos orgánulos celulares, seguido de la fragmentación del núcleo y del citoplasma que, dan lugar a lo que se denomina cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio extracelular⁵⁹.

En función de la naturaleza del estímulo generador de muerte se conocen dos vías de inducción de apoptosis: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (figura 6). Sin embargo, independientemente de la vía apoptótica, el proceso siempre resulta en la activación de una cascada de proteasas denominadas caspasas⁶⁰. Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de ácido aspártico y que para evitar una activación inadecuada son sintetizadas como zimógenos que deben proteolizarse. Las caspasas responden al estímulo apoptótico mediante activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o inactivación de diferentes sustratos celulares y provoca la muerte celular. Se han identificado 12 caspasas diferentes que

dependiendo de la función que desempeñen se pueden clasificar en dos grupos⁶¹:

Grupo I. Se denominan caspasas inflamatorias ya que participan en la maduración de citoquinas. A este grupo pertenecen las caspasas -1, -4 y -5.

Grupo II. Participan en la apoptosis y pueden dividirse en dos subgrupos:

Caspasas iniciadoras o apicales: a este grupo pertenecen las caspasas -2, -8, -9 y -10. Estas caspasas se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las caspasas efectoras.

Caspasas efectoras o ejecutoras: este grupo lo componen la caspasas -3, -6 y -7 y son las responsables de la proteólisis de los sustratos celulares que provoca la desorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis

Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte

Esta vía de inducción de apoptosis implica la señalización a través de receptores de muerte situados en la superficie de la célula, que reciben la señal de ligandos de muerte específicos para cada uno de ellos. La mayoría de los receptores de muerte pertenecen a la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína y una secuencia situada en su dominio intracitoplasmático, denominada dominios DD, que acoplan al receptor con el resto de la maquinaria apoptótica⁶².

Cuando el ligando se une al receptor, la señal de muerte se transmite mediante el complejo señalizador de inducción de muerte (DISC) produciéndose la activación de las caspasas -8 y -10 y propagándose la señal apoptótica al citosol⁶³.

Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial

Los principales reguladores intracelulares de la muerte celular programada son las proteínas de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas consta de miembros antiapoptóticos y proapoptóticos que pueden suprimir o promover la apoptosis⁶⁴. Se identifican por la presencia en su estructura de al menos uno de los cuatro dominios descritos BH (BH1-4). De estos dominios parece que BH3 está directamente relacionado con una función proapoptótica y el resto de ellos con una función antiapoptótica⁶⁵. Así, de acuerdo a los dominios BH y a su función, las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en tres grupos⁶⁶:

- **Proteínas antiapoptóticas** como Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1.

- **Proteínas proapoptóticas multidominio o efectoras** como Bax y Bak,

- Proteínas proapoptóticas “sólo BH3” como Bad, Noxa, Bid y Bim.

El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis. Cuando no hay señales proapoptóticas, los miembros antiapoptóticos interaccionan con el dominio BH3 de los miembros proapoptóticos, inhibiéndolos y aumentando la supervivencia celular. Por el contrario, cuando aparece el estímulo de apoptosis, las proteínas proapoptóticas “solo BH3” se activan, inhibiendo a las antiapoptóticas y activando a otras proapoptóticas. En concreto, la proteína Bax forma un heterodímero con Bak que se inserta en la membrana mitocondrial y provoca que ésta se permeabilice. Estos eventos promueven la liberación del citocromo c al citoplasma para unirse a Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas) que tras sufrir un cambio conformacional recluta a la procaspasa-9 y forma un complejo denominado apoptosoma. Éste favorece la activación de la caspasa-9, que a su vez activa a las caspasas ejecutoras -3 y -7, produciéndose la rotura de diversos sustratos^{59,66}. Entre ellos, la ruptura de la proteína PARP (poli-(ADP-ribosa)-polimerasa) por la caspasa-3 en las fases finales del proceso apoptótico se utiliza frecuentemente como marcador de apoptosis^{61,67}.

La apoptosis inducida tras el tratamiento con taxanos ocurre por la vía intrínseca mitocondrial.

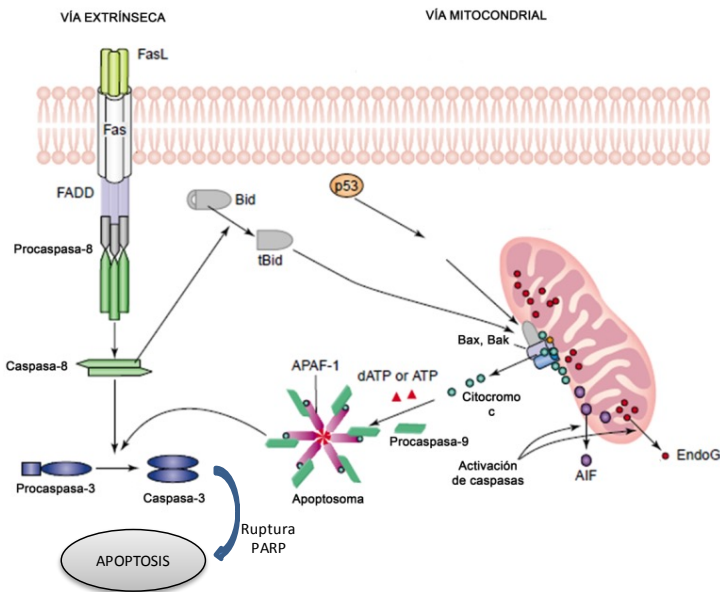


Figura 6. Representación esquemática de la vía extrínseca y de la vía intrínseca de la apoptosis. Adaptado de Hong SJ et al, 2004⁶⁸.

4. Ciclo celular

El ciclo celular consiste en la replicación del ADN y el empaquetamiento de los cromosomas resultantes de la replicación en dos células hijas mediante una serie de eventos ordenados y controlados estrictamente. El ciclo celular eucariótico se divide en dos etapas denominadas interfase y mitosis.

La primera etapa consta de las fases G1, S y G2. La fase G1 es el intervalo que sigue a una división celular, previa a la replicación del ADN en el que la célula dobla su tamaño y masa. Algunas células pueden parar su progresión en este estadio y permanecer en estado reposo sin aumento de la masa en lo que se denomina fase G0. La fase S corresponde al tiempo en el que se produce la replicación del material hereditario. El periodo comprendido entre la finalización de la replicación del ADN y el inicio de la división es la fase G2.

A continuación, las células entran en la fase de mitosis M propiamente dicha. Durante la primera fase de la mitosis (profase) desaparece la membrana nuclear y la cromatina se condensa para la generación de los cromosomas. Los microtúbulos se organizan a partir de dos cuerpos polares que se sitúan a ambos extremos de la célula, formando el huso mitótico, que va a servir como guía a los cromosomas. Seguidamente, los cromosomas se unen a los microtúbulos por medio de unas estructuras proteica denominada cinetocoros y se alinean en el centro de la célula formado la placa metastásica (metafase). Las cromátidas hermanas se separan, yendo cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando las cromátidas llegan a los extremos se descondensan, reaparece la membrana nuclear (telofase) y la célula empieza a escindirse (cintocinesis) por la zona media, dando lugar a dos células hijas. El reparto de los demás componentes tiene lugar prácticamente por el flujo de citoplasma, sin que se conozca ningún mecanismo que asegure una distribución equitativa como ocurre con los cromosomas³².

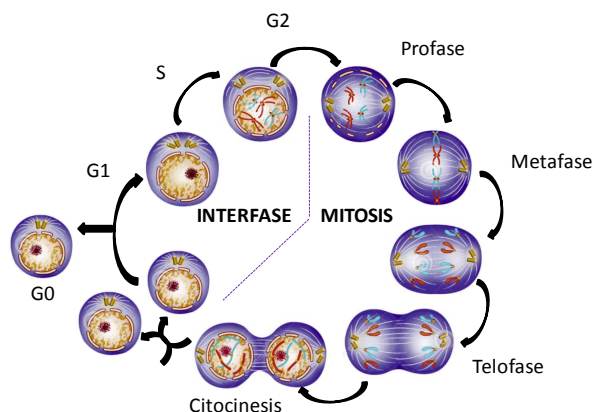


Figura 7. Esquema general del ciclo celular.

Regulación del ciclo celular

Puntos de control

La existencia de puntos de control es clave, ya que permite que todo el proceso tenga lugar cuando la célula está preparada mediante una triple comprobación de que se han dado las condiciones necesarias para iniciar una nueva fase⁶⁹. Según la literatura existen tres puntos de control ampliamente documentados: el punto de control de daño en el ADN, que puede dar lugar a la parada de la célula en G1, S, G2 o incluso M; el punto de control de replicación del ADN, que impide la entrada en mitosis hasta que no se haya completado la replicación del genoma correctamente; y el SAC, que impide la entrada en anafase hasta que todos los cromosomas estén correctamente unidos al huso mitótico y alineados en la placa metafásica. Este último asegura la correcta segregación cromosómica en mitosis, evitando así la aparición de aneuploidías. Como apuntábamos en el apartado anterior la activación de este punto de control provoca la parada del ciclo celular como consecuencia de la inhibición del APC/C³³.

Cdks

Asimismo, la maquinaria básica que controla el ciclo celular está constituida por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las CDKs son serina/treonina quinasas y constituyen la subunidad catalítica de un heterodímero, formado también por una subunidad activadora, la ciclina. Durante las distintas fases se forman y destruyen diferentes complejos de ciclinas y CDKs, que mediante la fosforilación de otras proteínas dirigen el avance del ciclo. Las CDKs están sometidas a una regulación muy estricta que permite que, pese a mantener sus niveles proteicos constantes durante el ciclo celular, su actividad fluctúe a lo largo del mismo⁷⁰ (figura 8).

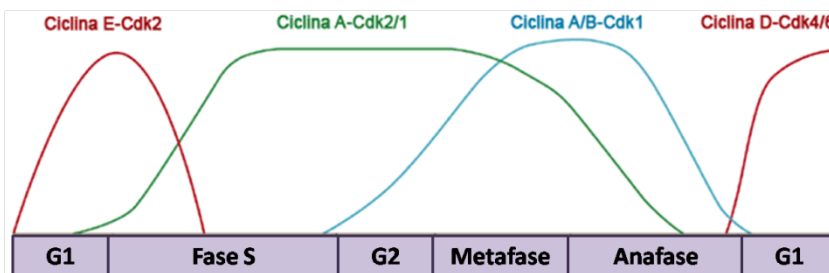


Figura 8. Actividad de los complejos CDK-ciclina en las distintas fases del ciclo celular. La actividad de los distintos complejos Cdk-ciclina (ciclinas G1 en rojo, -ciclinas de fase S en verde y -ciclinas mitóticas en azul) fluctúa a lo largo del ciclo celular. Adaptado de Bardin, 2001⁷⁰.

Asimismo, un grupo adicional de proteínas, los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKIs), son importantes para la coordinación de cada

etapa. Estas proteínas participan en la parada del ciclo celular relacionadas con procesos de senescencia, inhibición por contacto o activación de puntos de control de comprobación del ciclo celular.

En definitiva, la degradación de las diversas ciclinas tiene lugar en los puntos de control y este mecanismo, junto con la interacción con las CKIs, permite a la célula entrar en la siguiente fase⁶⁹.

Sistemas de degradación dependientes de ubiquitina

Sin embargo, el avance del ciclo celular también está regulado por la degradación de las proteínas que lo regula. De hecho, las oscilaciones en la actividad de CDKs necesarias para la progresión del ciclo celular se deben, en gran medida, a la acción de las ubiquitina ligasas. La proteólisis resulta útil para conducir estas oscilaciones debido a que, al tratarse de un proceso irreversible, fuerza el avance del ciclo en una sola dirección, ya que cada ciclo requiere la síntesis *de novo* de estos reguladores. Las células eucariotas utilizan esencialmente dos sistemas distintos pero complementarios para hacer frente eficazmente a la degradación de una amplia gama de sustratos: la vía de la autofagia/lisosoma y el sistema ubiquitina/proteasoma 26S.

A pesar de que el término “ubiquitina” también está aceptado en español, a lo largo de esta tesis utilizaremos el término “ubiquitina”.

Autofagia/lisosoma

La autofagia, denominada también macroautofagia, consiste en un sistema de degradación en el que el material intracelular se transporta en vesículas, que reciben el nombre de autofagosomas, hasta fusionarse con los lisosomas. Este proceso actúa como un mecanismo regulador de la homeostasis intracelular ya que los materiales citoplasmáticos se degradan y reciclan para mantener el metabolismo energético de la célula⁷¹. Así, la autofagia puede ser selectiva (dirigida a proteínas de vida media larga, orgánulos dañados, agregados de proteínas o patógenos intracelulares) o no selectiva (envuelve en las vesículas porciones del citosol de manera aleatoria).

En el proceso de autofagia selectiva interviene un conjunto de proteínas denominadas por consenso proteínas autofágicas ATG (del inglés *Autophagy-related protein*)⁷². En mamífero la autofagia se inicia con la formación de un fagóforo una estructura de doble membrana que secuestra material citoplasmático, y que posteriormente se alarga hasta crear un autofagosoma. La formación del fagóforo requiere del complejo ULK1 (iniciación), que está regulado por el complejo mTOR (receptor de la rampamicina de los mamíferos) y de la interacción del complejo beclina-1/VSP34 (nucleación). La elongación, cierre y maduración del fagóforo requiere de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina: el complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 y cadena

ligera 3 (LC3)-II. Es necesario la lipidación de LC3 que convierte LC3 de su forma soluble en el citoplasma (LC3-I) a la forma asociada a los autofagosomas unida a la doble membrana (LC3-II) del fagóforo⁷². Así, el reclutamiento de LC3-II al autofagosoma es la etapa limitante de la velocidad del proceso de expansión de la membrana ya que media el cierre de la membrana y la fusión con el lisosoma⁷². Una vez que el autofagosoma está totalmente expandido, LC3-II y el complejo ATG12-ATG5-ATG16 se disocian de la membrana del autofagosoma. Tras la maduración, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma formando un autofagolisosoma donde el material englobado es seleccionado a través de interacciones proteicas, por los receptores específicos de autofagia. Un ejemplo de estas proteínas lo constituye p62 o secuestrosoma-1 (p62/SQSTM1) capaz de reconocer proteínas ubiquitinadas a través del dominio UBA (del inglés *Ub-associated*) para formar agregados reconocidos por la LC3-II y reclutarlos en el interior del autofagosoma⁷³.

El sistema del Proteasoma dependiente de ubiquitina

El sistema ubiquitina proteasoma es el responsable de la degradación selectiva de una gran variedad de proteínas en la célula eucariota. La degradación de proteínas mediada por este sistema juega un papel central en el control de numerosos procesos como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales o la regulación transcripcional. Por ello, defectos en este sistema de degradación puede conducir a patologías como la transformación neoplásica⁷⁴. De manera simplificada la degradación de proteínas dependientes de ubiquitinación comprende dos pasos fundamentales: el marcaje de la proteína sustrato mediante la unión covalente de una o múltiples moléculas de ubiquitina y la degradación de las proteínas marcadas por un complejo 26S del proteasoma, con la consecuente liberación de ubiquitinas.

Proteasoma

El proteasoma 26S es un macrocomplejo proteico compuesto por un núcleo proteolítico 20S y una partícula reguladora 19S también conocida como PA700. El complejo central 20S alberga las actividades proteolíticas mientras que la partícula reguladora 19S es la responsable del reconocimiento, desubiquitinación y desplegamiento de los sustratos poliubiquitinados⁷⁵ (figura 9).

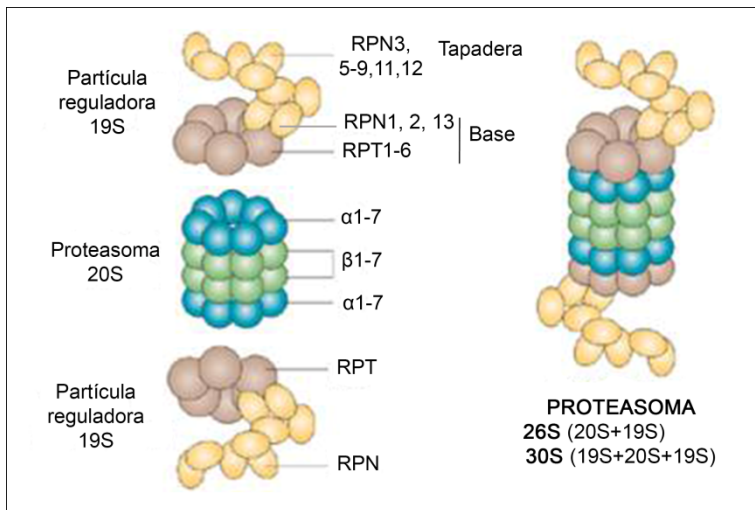


Figura 9. Esquema del proteasoma 26S. Adaptado de H-C Tai and E.M. Schuman⁷⁶.

El núcleo proteolítico está formado por 28 subunidades repartidas en cuatro anillos hetero-heptaméricos apilados ($7\alpha7\beta7\beta7\alpha$) que forman un canal central. Los dos anillos exteriores son idénticos, constituidos por siete subunidades α distintas, y son los encargados de regular la entrada de los sustratos a la cámara proteolítica interior. Esta cámara está formada por dos anillos interiores, también idénticos entre sí, constituidos por 7 subunidades β diferentes, tres de las cuales poseen actividades catalíticas ($\beta1$, $\beta2$ y $\beta5$)⁷⁷.

La entrada del sustrato a la cámara proteolítica está bloqueada por un mecanismo que requiere la unión de la subunidad reguladora 19S. Esta partícula reconoce las proteínas marcadas con ubiquitinas, retira las cadenas de ubiquitinas, desnaturaliza las proteínas, abre el anillo α y transfiere las proteínas desnaturalizadas al interior del núcleo proteolítico para su destrucción⁷⁸. La partícula reguladora 19S se puede dividir en dos subcomplejos llamados base y tapadera. La base está compuesta de seis proteínas con actividad ATPasa (Rpt1-6) y otras cuatro que carecen de esta actividad (Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13). Su anillo de ATPasas se encuentra en contacto directo con la partícula 20S lo que permite la captura y desnaturalización de las proteínas y el control de la apertura del canal del anillo α . La tapadera está formada por siete subunidades que carecen de actividad catalítica (Rpn3, Rpn5-9 y Rpn12) y por la metaloproteasa Rpn11. Esta última corta las cadenas de ubiquitinas que serán llevadas a monómeros por otras DUBs asociadas al proteasoma.

Las DUBs constituyen una familia de enzimas que se encargan de eliminar las ubiquitinas de los sustratos diana para rescatarlos de la degradación,

terminar cualquier señalización que la ubiquitinación pudiera haber proporcionado e intervienen en el reciclaje de las ubiquitinas^{79,80}.

La ubiquitinación de sustratos

Las ubiquitinas son pequeñas proteínas de 76 aminoácidos que pueden unirse de manera covalente a las proteínas sustrato o a otra ubiquitina. La molécula de ubiquitina tiene siete lisinas muy conservadas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) que son usadas *in vivo* para formar cadenas de poliubiquitinas. La elongación de las cadenas de poliubiquitina se consigue mediante el establecimiento de un enlace isopeptídico entre el residuo de glicina carboxilo terminal de la ubiquitina “n+1” con el grupo ε-amino de un residuo de lisina de la ubiquitina anterior (n). Dado que cada molécula de ubiquitina contiene siete residuos de lisina, se puede generar una gran variedad de cadenas de poliubiquitina desde el punto de vista morfológico, con distintas funciones celulares. La degradación por el proteosoma depende, principalmente, de cadenas unidas a través de K48 o K11⁸¹. Si una proteína presenta una sola ubiquitina en los residuos de lisina, se habla de monoubiquitinación o multi-monoubiquitinación, pero si presenta más se considera poliubiquitinación.

De manera simplificada, la poliubiquitinación es el resultado de una cascada de reacciones catalizadas por tres enzimas. De modo que E1 (enzima activadora de ubiquitina) activa la ubiquitina mediante la formación de un enlace tiol éster entre la cisteína del sitio activo y el residuo de glicina de la ubiquitina. A continuación, la ubiquitina activada es transferida mediante la formación de un nuevo enlace tiol éster a un residuo de cisteína del sitio activo de E2 (enzima conjugadora de ubiquitina). Finalmente, la molécula de ubiquitina se une a la proteína sustrato mediante un enlace isopeptídico con el grupo ε-amino de los residuos de lisina. Esta unión puede ser llevada a cabo directamente por E2 o en conjunción con la enzima E3 (ubiquitin ligasa) que confiere la especificidad del sustrato⁸¹ (figura 10).

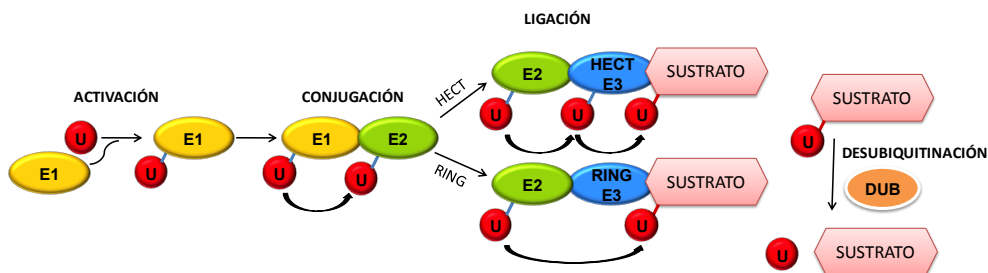


Figura 10. Representación esquemática del proceso de ubiquitinación de proteínas. La ubiquitina (U) es activada por la enzima activadora E1 y posteriormente es transferida a enzima conjugadora E2. Finalmente se une al sustrato que está enlazado específicamente a una E3-ligasa. En las E3-ligasas con dominio HECT la ubiquitina se transfiere desde la E2 hasta la E3 y posteriormente al sustrato,

mientras que en las E3-ligasas con dominio RING la ubiquitina se transfiere desde la E2 directamente al sustrato.

En una visión simplificada, las ligasas E3 se caracterizan por la presencia de al menos dos dominios funcionales: un dominio que media la interacción con las enzimas E2 y otro dominio responsable del reconocimiento específico de las proteínas sustrato. Así, dependiendo de la identidad del dominio implicado en la interacción con las enzimas E2, las ligasas E3 se pueden agrupar en dos grandes familias: con dominio HECT (Homologous to E6-associated proteína C Terminus) o con dominio RING (Really Interesting New Gene). A diferencia de las ligasas con dominio HECT que forman un enlace tiol éster con la ubiquitina y la transfieren directamente al sustrato, las E3 con dominio RING o RING-like no forman un enlace tiol con la ubiquitina pero funcionan como adaptadores para facilitar la interacción entre los sustrato y el enzima E2.

A su vez, la familia de las ligasas E3 de tipo RING/RING-like se divide en dos subfamilias, las que constan de una sola subunidad y las que tienen múltiples subunidades. A esta última subfamilia pertenecen las ligasas de tipo RING-culina (CRL), que incluyen dos enzimas estructuralmente similares implicadas en la degradación de proteínas clave en la regulación del ciclo celular: el complejo SFC (Spk1/Cul1/proteína F-box) y el APC/C⁸².

El complejo promotor de la anafase o ciclosoma APC/C

El APC/C es un complejo multiproteico formado por al menos 12 proteínas diferentes en humanos. Su actividad oscila a lo largo del ciclo celular, de tal manera que presenta una actividad baja en las fases S y G₂, y elevada durante mitosis y G₁. Estas oscilaciones son responsables, en gran medida, de la progresión del ciclo celular, y desempeñan, sobre todo, un papel crucial en la transición metafase-anafase y G₁. La asociación transitoria de los cofactores CDC20 y CDH1 al APC/C es clave para definir su tiempo de activación. Así, mientras que el APC/C^{CDC20} es el responsable primario de promover la separación de las cromátidas hermanas durante la anafase y del inicio de la salida de mitosis, el APC/C^{CDH1} es responsable de la finalización de la salida de mitosis y de la progresión del ciclo durante la fase G₁⁸³.

El complejo SFC (Spk1/Cul1/proteína F-box)

El complejo SCF está implicado principalmente en la degradación de proteínas desde G₁ hasta el principio de mitosis. Está formado por tres componentes invariables: una proteína con estructura RING-finger que se une a E2 conocida como RBX1; una proteína adaptadora llamada SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1); y una proteína de andamiaje que se une a tanto RBX1 como a SKP1, denominada CUL1. Además, este complejo posee un componente variable conocido como proteína F-box. Ésta se une a

SKP1 a través de un dominio de 40 aminoácidos amino-terminal denominado motivo F-box, y es responsable del reconocimiento de sustratos⁸⁴ (figura 11).

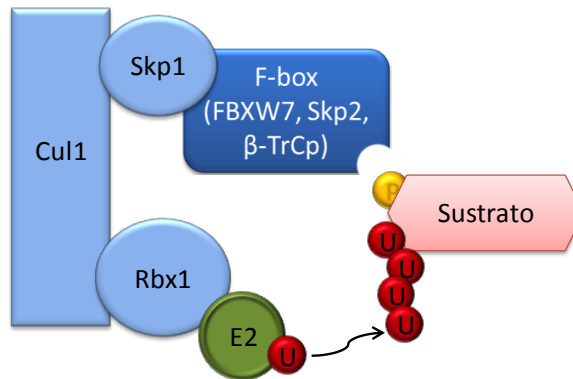


Figura 11. Representación esquemática del complejo SFC (Spk1/Cul1/proteína F-box).
Adaptado de M. Welcher and BE. Cluman, 2008⁸⁵.

La especificidad de los complejos SCF se controla por la interacción con los sustratos. Según el modelo clásico las proteínas F-box reconocen a sus sustratos a través de sus degrones, unos motivos cortos y definidos, que deben estar fosforilados para su reconocimiento, por lo que se les denomina entonces fosfodegrones⁸⁶. Éstos pueden fosforilarse por una o por múltiples quinasas, y además pueden requerir una fosforilación previa en algún otro sitio, que no necesariamente debe ser la superficie de interacción entre ambas proteínas.

En humanos, se han identificado aproximadamente 70 proteínas F-box, lo que permite a esta familia de ligasas el marcaje de una amplia gama de proteínas^{87,88}. Basado en los dominios F-box de unión a los sustratos, las proteínas F-box se pueden clasificar en tres categorías: FBXW (presentan repeticiones WD40), FBXL (presentan repeticiones ricas en leucina) y FBXO (con otros dominios estructurales diferentes)⁸⁷. Se conocen tres proteínas F-box involucradas en el control del ciclo celular: FBXW7 y β -TrCP, de la categoría FBXW; y SKP2, perteneciente a la clase FBXL⁸⁴.

SKP2 (del inglés *S-phase kinase-associated protein 2*) (FBXL1) está activo durante las fases S y G2 y es responsable de la degradación de algunos reguladores negativos del ciclo celular entre los que se encuentran varios CKIs como de p21, p27 y p57. Debido su papel en la degradación de las estas proteínas este complejo ubiquitina ligasa se comporta como un oncogen y se encuentra frecuentemente sobreexpresado en diversos cánceres humanos⁸⁹.

β -TrCP (del inglés *β -transducin repeat-containing protein*) (FBXW1/11) está implicado en la degradación de proteínas que juegan un papel tanto positivo como negativo en la progresión por el ciclo celular, motivo por el

que puede compartirse como oncogén o como supresor tumoral. Entre sus dianas se encuentran las fosfatasa CDC25A y CDC25B, que contribuyen a la activación de las CDKs mediante la eliminación de residuos fosforilados; la quinasa Wee1, que fosforila CDK1 inhibiendo su actividad, EMI1⁹⁰ y securina^{91,92}.

5. La ligasa de ubiquina SCF^{FBXW7}

Mención aparte merece la ubiquina ligasa SCF^{FBXW7} al ser uno de los temas centrales de esta tesis.

SCF^{FBXW7} (del inglés *F-box and WD-40 domain protein 7*) está considerado un supresor tumoral debido a su implicación en la degradación proteica de numerosas oncoproteínas entre las que se encuentran la ciclina E, c-Myc, c-Jun y Notch-1⁸⁵ que inducen la degradación de reguladores positivos del ciclo celular.

Estructura e isoformas de FBXW7

FBXW7 es una proteína F-box de la ligasa de ubiquitina E3 SKP1-CUL1-FBXW7 (SCF^{FBXW7}), responsable de reclutar sustratos específicos para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma. FBXW7 también es conocido como FBW7 o hCDC40 en humanos, Cdc4 en *Saccharomyces cerevisiae*, Sel-10 en *Caenorhabditis elegans* o Ago en *Drosophila melanogaster*^{84,85}.

En humanos el gen *FBXW7* se extiende sobre 200 Kb en el cromosoma 4 y produce tres transcritos como resultado de la maduración alternativa del ARN. Su organización genómica permite el control transcripcional específico de cada isoforma y la expresión de cada una de ellas desde su propio promotor. Cada transcrito contiene un primer exón específico de la isoforma y comparten los diez siguientes exones, dando lugar a tres isoformas proteicas (α , β y γ) que difieren en su N-terminal⁹³. La información codificada en el primer exón contiene señales que dirigen las isoformas a distintos compartimentos subcelulares de manera que FBXW7 α se localiza en el nucleoplasma, FBXW7 β en el citoplasma y FBXW7 γ tiene una distribución nucleolar⁸⁵. Sin embargo, aún se desconoce el papel fisiológico exacto y el mecanismo de regulación de cada una de ellas y queda por determinar si funcionan cooperativamente o por separado en la ubiquitinación de los sustratos. Se ha demostrado que la expresión de la isoforma α es constante a lo largo del ciclo y es además la responsable de la degradación de la mayoría de los sustratos⁹⁴, FBXW7 β es más abundante en el cerebro y testículos, FBXW7 γ en el corazón y en el músculo esquelético⁹³.

Las tres isoformas comparten varios dominios que permiten su interacción con los sustratos. Contienen un dominio F-box responsable de reclutar al

resto del complejo SCF mediante su interacción directa con SKP1⁹⁵. Además presentan ocho repeticiones WD40 que permiten la unión a sus sustratos. Estas repeticiones WD40 forman una estructura denominada “bolsillo de unión”, que reconoce y se une a los fosfodegrones de los sustratos⁹⁶. Estos fosfodegrones poseen la siguiente estructura consenso ϕ -X- ϕ - ϕ - ϕ -(T/S)-P-X-X-(S/T/E) y se les denomina CPDs (CDC4-PhosphoDegron). Este motivo consiste en un residuo fosforilable en la posición central seguido de una prolina y de otro residuo fosforilable en posición +4. La fosforilación del residuo fosforilable central es mediada, en muchos casos, por la quinasa GSK3. En algunos sustratos la secuencia del fosfodegron se aleja ligeramente de la óptima, por ejemplo por la presencia de un aminoácido cargado en lugar del residuo fosforilable en posición +4, lo que disminuye su afinidad por la proteína F-box⁹⁷.

Dentro de las repeticiones WD40 existen tres residuos conservados de argininas que hacen contacto directo con los sustratos fosforilados y que son los puntos calientes. La mayoría de las proteínas mutantes de FBXW7 en los tumores presenta alteraciones en estos puntos de reconocimiento, de modo que esta interrupción de la unión a los sustratos juega un papel esencial en la pérdida de función del FBXW7. Finalmente, FBXW7 contiene un dominio de dimerización (DD) que posibilita su dimerización para incrementar la eficiencia de ubiquitinación de los sustratos ya que permite ampliar el número de residuos de lisina del sustrato susceptibles de ser ubiquitinados⁸⁵.

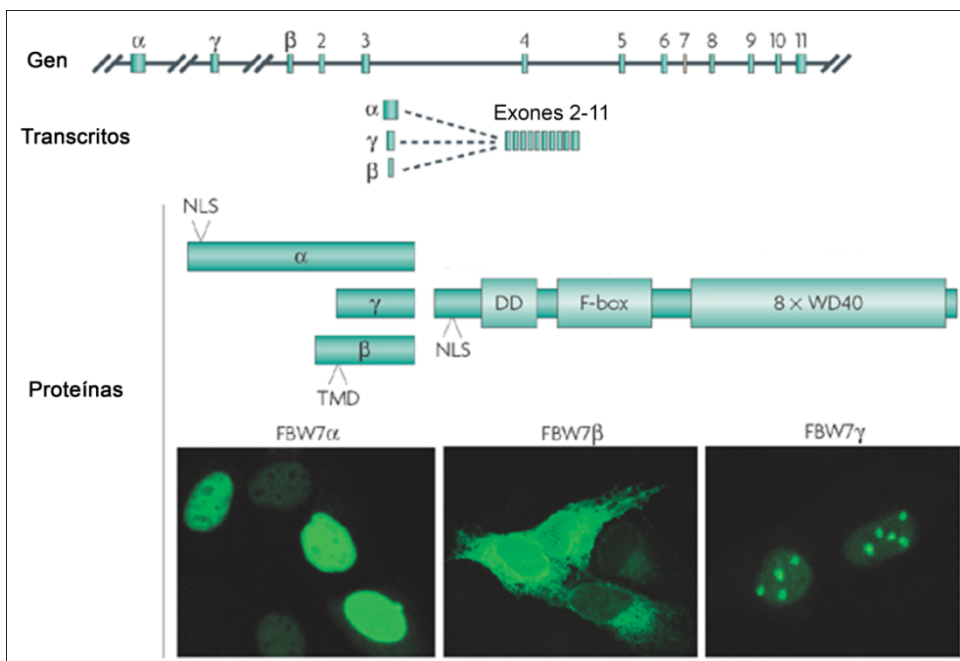


Figura 12. Organización del gen, de FBXW7, ARN mensajeros y las isoformas de las proteínas. Adaptado de M Welcker and BE Cluman, 2008⁸⁵.

Mecanismos de regulación

Si bien es cierto que numerosas evidencias han desmostrado una fuerte asociación entre la desregulación FBXW7 y el proceso de tumorigénesis, en la actualidad el conocimiento que se tiene de los mecanismos que controlan la expresión y actividad de esta ligasa es aún muy limitado. Así por ejemplo, el hecho de que cada isoforma posea diferentes promotores sugiere que cada una de ellas se regula de manera diferente⁸⁵.

Por una parte, existen estudios que evidencian que el supresor tumoral p53 regula la expresión de FBXW7⁹⁸. Dado que sólo el promotor β contiene un sitio de unión concenso de p53, se ha demostrado que tras someter a las células a radiación ultravioleta la expresión de FBXW7 β se induce de manera p53 dependiente en respuesta al daño del ADN^{98,99}. Se ha demostrado también que cuando FBXW7 α se encuentra fosforilado la propil isomerasa PIN1 interacciona directamente con éste, lo que impide su dimerización y promueve su autoubiquitinación y degradación¹⁰⁰. La sobreexpresión de PIN1 se asocia con mal pronóstico clínico en los pacientes con cáncer de mama¹⁰¹.

Además, se ha demostrado que si la F-box no está asociada a ningún sustrato, ésta es capaz de propiciar su autoubiquitinación a través de sus repeticiones WD40 para su posterior degradación¹⁰². Asimismo, se ha comprobado que C/EBP δ inhibe de manera directa la expresión de FBXW7 durante la hipoxia. C/EBP δ potencia la ruta mTOR/Akt/S6K1 lo que promueve la traducción de HIF-1 α , necesaria para la adaptación a la hipoxia y la metástasis tumoral¹⁰³, a través de la inhibición de FBXW7 ya que tanto mTOR como HIF-1 son sustratos de FBXW7. Recientemente, también se ha identificado que EBP2, proteína del antígeno nuclear Epstein-Bar actúa como un pseudosustrato que regula la localización nucleolar de FBXW7^{104,105}.

Otros reguladores de FBXW7 son los microRNAs (miRNAs) que regulan la expresión del gen a nivel post-transcripcional. Por ejemplo, se ha demostrado que miR-27a inhibe la expresión de FBXW7¹⁰⁶. Además se ha visto que existe una relación inversa entre la expresión de miR-27a y los niveles de FBXW7 en muestras de tejido humano. Lerner et al demostraron que miR-27a actúa como supresor de FBXW7 durante la transición G1/S e inhibe también la ubiquitinación y degradación de Ciclina E, lo que conduce a una progresión anormal del ciclo y provoca estrés replicativo¹⁰⁷. También existen evidencias que demuestran que miR-223 podría modular de manera directa la expresión de FBXW7 en cáncer gástrico, esofágico y leucemias^{108,109} y que la sobreexpresión de miR-223 reduce los niveles de ARNm de FBXW7 y aumenta tanto la proteína como la actividad de la ciclina E endógena¹¹⁰.

Por otra parte, un cúmulo de evidencias ha demostrado que FBXW7 se inactiva frecuentemente por mutación, delección o hipermetilación del promotor en múltiples neoplasias. Se ha encontrado que FBXW7 se inactiva por mutaciones en diversos tipos de cáncer humanos con una frecuencia de mutación en general de un 6%. Las mayores frecuencias de mutación se dan en colangiocarcinomas (35%), leucemias linfocíticas T (31%) y carcinomas de colon (9%), endometrio (9%) y estómago (6%)¹¹¹. Entre las mutaciones más comunes se encuentran mutaciones sin sentido que afectan a tres residuos de arginina (Arg465, Arg479 y Arg505) en el bolsillo de unión al sustrato del FBXW7 implicadas en las interacciones con los fosfodegrones lo que conduce a una reducción de la afinidad de los sustratos por FBXW7⁹⁶. Por ejemplo se ha publicado que hCdc4 está mutado en un 17% de los carcinomas de endometrio provocando acumulación de Ciclina E⁹³ y que está mutado en un 70% en leucemia linfoblástica aguda T con consecuencias funcionales en la vía de señalización de NOTCH¹¹². También se ha identificado que las delecciones del gen de FBXW7, localizadas en el cromosoma 4q31, son frecuentes en los tumores humanos y ocurren en más del 30% de las neoplasias como por ejemplo en cáncer de mama¹¹³.

Asimismo, mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN también parecen influir en la regulación de FBXW7. La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a la posición 5' del anillo pirimidínico de las citosinas que van seguidas de guaninas –denominados nucleótidos CpG. La implicación de la metilación del ADN en la regulación transcripcional ha sido bastante estudiada dada su repercusión directa sobre la actividad génica¹¹⁴. Así, la hipermetilación del ADN en regiones promotoras reprime la iniciación de la transcripción¹¹⁵, por lo que los cambios de metilación pueden modular el grado en que un gen es expresado. Por ello no resulta sorprendente que alteraciones en los patrones de metilación, generalmente en genes supresores de tumores (TSG), sean eventos frecuentes en cáncer¹¹⁶. Recientemente se ha demostrado que el promotor de FBXW7/hCDC4-β se encuentra inactivado por hipermetilación en un 51% de carcinomas primarios de mama y se asocia a pronóstico favorable a pesar de su asociación con parámetros clínicos adversos¹¹⁷. Muchos de estos tumores con mutaciones de FBXW7 mostraron niveles elevados de Ciclina E y desregulación del ciclo celular^{93,118}. Asimismo, un estudio diferente también demostró la pérdida de expresión de FBXW7 en una serie de carcinomas de mama donde Ciclina E estaba aumentada y asociado con pobre pronóstico¹¹⁹. A pesar de estos hallazgos todavía no se ha estudiado la relación entre la expresión FBXW7 con otros sustratos en carcinomas de mama.

Funciones

Dado que FBXW7 media la ubiquitinización para la destrucción de un gran número de onoproteínas conocidas, como ciclina E, c-Myc, Aurora kinasa A (AURKA) y Notch-1, FBXW7 es aceptado generalmente como un tumor supresor. Por ello tampoco es sorprendente que la función de FBXW7 haya sido ligada a importantes procesos como progresión del ciclo celular, proliferación, apoptosis, diferenciación o respuesta al daño del ADN. Así, la inactivación de FBXW7 causa desregulación de numerosos programas celulares específicos asociados con las principales características distintivas del cáncer.

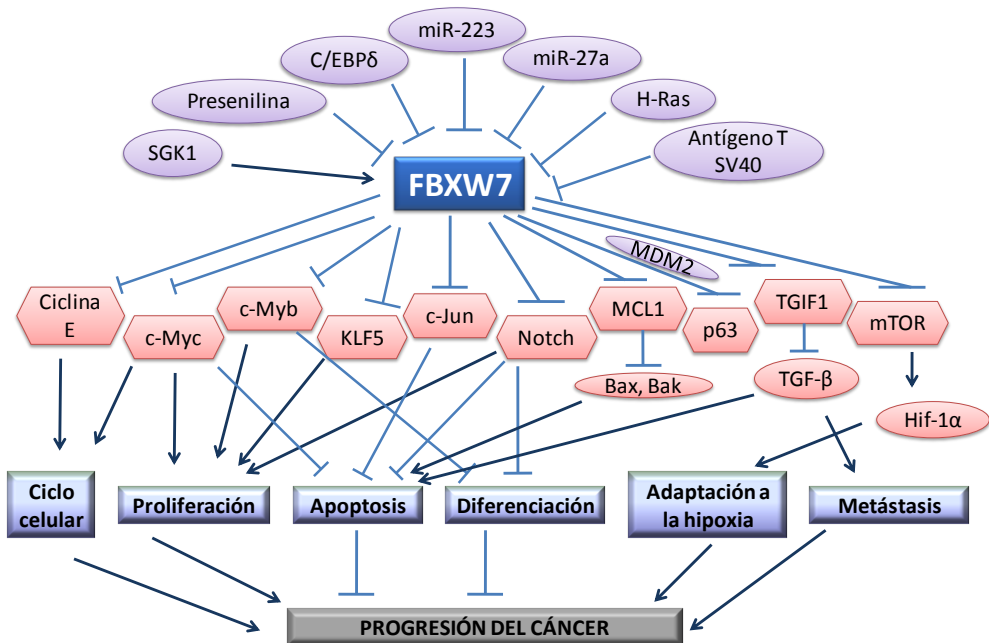


Figura 13. Representación esquemática de las funciones de FBXW7 y de su regulación en relación con la progresión del cáncer. Adaptado de Y. Cheng and G. Li, 2012¹²⁰.

En esta tesis abordaremos el estudio de la influencia de FBXW7 sobre los sustratos Ciclina E, c-Myc, AURKA, PLK1 y MCL1.

6. Ciclina E

Es un componente clave en la maquinaria de ciclo celular ya que su asociación con CDK2 le confiere un papel crítico en la transición G1/S¹¹³. Dada su importante función, tanto la cantidad como la actividad de ciclina E están estrictamente controladas por la degradación dependiente del proteasoma. Por su parte, la ciclina E contiene dos CPD: un CPD carboxilo-terminal y otro amino-terminal. El primer CDP posee dos sitios de

fosforilación: Thr380, que puede ser fosforilado tanto por CDK2 como por GSK3, y Ser384, que es fosforilada exclusivamente por CDK2. Así, cuando Thr380 se encuentra fosforilado FBXW7 se une directamente a la ciclina E y la ubiquita¹²¹. En cuanto a la fosforilación de Ser384 incrementa la fuerza del CPD y determina si la ubiquitinización de la ciclina E se producirá por la forma monomérica o dimérica de FBXW7. Así cuando la fosforilación en Ser384 está inhibida la forma dimérica de FBXW7 es la encargada de ubiquinizar a ciclina E, mientras que por el contrario cuando ambos sitios, Thr380 y Ser384, se encuentran hiperfosforilados la forma monomérica de FBXW7 ubiquitina a ciclina E de manera eficiente¹²². Si bien es cierto que el CPD amino-terminal es menos potente, estudios *in vivo* han demostrado que su sitio de fosforilación, Thr62¹²³ también juega un papel importante en la regulación de la actividad de ciclina E.

Además tanto FBXW7 como p53 cooperan en la regulación de ciclina E. Así en ausencia de FBXW7 la vía de p53 induce a p21^{CIP1} que inhibe directamente la actividad de Ciclina E-CDK2¹²⁴.

Asimismo, un cúmulo de evidencias ha relacionado la sobreexpresión de ciclina E con inestabilidad cromosómica y cáncer¹²⁵. En este marco, el estudio realizado por Scott KA et al. demostró por una parte, que esta ciclina se encontraba sobreexpresada en algunos carcinomas de mama y por otra, que la expresión de ciclina E y p53 correlacionaba con una menor diferenciación de los tumores, así como con una mayor agresividad y proliferación de las células tumorales. Sin embargo, aún no se ha quedado completamente establecido el papel pronóstico de la expresión de ciclina E en carcinoma de mama¹²⁶. Por ejemplo en las investigaciones llevadas a cabo por Kim et al. no se encontró asociación entre sobreexpresión de ciclina E y riesgo de recidiva locorregional en carcinomas primarios de mama¹²⁷. En cuanto a su relación con receptores hormonales, varios estudios han asociado la sobreexpresión de ciclina E con la ausencia de expresión de estos receptores¹²⁸, lo que sugiere que el papel de esta ciclina en la regulación del crecimiento del tumor podría ser hormonoindependiente.

7. c-Myc

Es un factor de transcripción capaz de activar y reprimir la transcripción un amplio espectro de genes¹²⁹. Entre sus funciones destacan la regulación de la proliferación, la diferenciación, y el crecimiento celular, la síntesis y la apoptosis. Así c-Myc promueve la progresión de la fase G0/G1 a la fase S del ciclo celular, la salida de quiescencia y estimula la progresión celular en G1, a través de la activación de factores de regulación del ciclo como ciclina D, CDK4 o E2F1 y la inhibición de CKIs como p21. En cuanto a su función

en apoptosis, actúa estabilizando la proteína proapoptótica p53, y de forma indirecta, inhibe proteínas antiapoptóticas como Bcl2¹³⁰.

Una vez activada, la proteína c-Myc tiene una vida media muy corta, por lo que la regulación de su degradación es de vital importancia. Numerosos estudios demuestran que c-Myc es ubiquitinada y degradada vía proteasoma. La fosforilación de la Ser62 por quinasas específicas estabiliza y activa a c-Myc, mientras que la posterior fosforilación de la Thr58 favorece su ubiquitización y posterior degradación¹³¹. El complejo SCF^{FBXW7} reconoce a c-MYC fosforilado en Thr58 por GSK3¹³² y controla la estabilidad de c-MYC en la fase G1 del ciclo celular. En muchos tumores se han encontrado una cantidad elevada de la proteína c-Myc, como resultado de la amplificación del gen o de mutaciones que afectan a la estabilidad de la proteína¹²⁹.

8. AURKA

Pertenece a una familia de serina/treonina quinasas y su función está relacionada con la regulación de la segregación de cromosomas y citocinesis¹³³. AURKA se localiza en los centrosomas desde el momento de la duplicación de los mismos hasta la salida de mitosis¹³⁴. La activación de esta quinasa tiene lugar por autofosforilación a través de su interacción con TPX2¹³⁵. Varias publicaciones han reportado que la degradación de AURKA se produce en la mitosis tardía y entrada en G1 vía proteasoma mediada por APC/C^{CDH1} o SCF. En este sentido, ciertos estudios han demostrado que FBXW7 se une físicamente a AURKA y facilita su ubiquitinación¹³⁶. A pesar de que algunas investigaciones han mostrado que la depleción de FBXW7 resulta en un incremento de la expresión de AURKA⁹⁹, el mecanismo por el que FBXW7 controla el nivel de AURKA no se conoce completamente del todo.

Asimismo, un gran número de datos muestran que la sobreexpresión de AURKA conduce a la amplificación de los centrosomas, inestabilidad cromosómica y transformación oncogénica¹³⁷. De hecho, esta quinasa se encuentra frecuentemente amplificada en una variedad de carcinomas humanos, entre los que se encuentran cáncer de mama, colorectal, páncreas y vejiga^{138,139}. Además la sobreexpresión de AURKA en tumores se ha relacionado con la enfermedad clínicamente agresiva¹⁴⁰ y en modelos de ratones transgénicos ha resultado en el desarrollo de tumores en la glándula mamaria¹⁴¹.

9. PLK1

PLK1 es uno de los cinco miembros de la familia de las quinasas Polo (PLK1-5). La serina/treoninas quinasa PLK1 tiene un papel clave en la

división de las células eucariotas¹⁴², de hecho está implicada en numerosos eventos como la entrada y salida de mitosis, la dinámica de los microtúbulos y de los cromosomas y el inicio de la citocinesis¹⁴³.

La expresión de PLK1 durante el ciclo celular alcanza su máximo nivel durante las fases G2 y M. Tras la mitosis, y a lo largo de la fase G1, llega a niveles indetectables, y durante la fase S, comienza a acumularse de nuevo. Así, durante metafase PLK1 es reclutada por numerosas proteínas como BubR1¹⁴⁴ y posteriormente es degradada durante la anafase tardía por el APC/CCDH1/proteasoma, para controlar apropiadamente la salida de mitosis y la citocinesis¹⁴⁵. De igual modo, el APC/C^{CDH1} está implicado en la degradación de PLK1 tras daños en el ADN durante la fase G2¹⁴⁶. Recientemente, el grupo del Dr. Francisco Romero, con el que colaboramos, identificó que PLK1 se ubiquitina y degrada vía SCF/FBXW7 α /proteasoma para modular el punto de control de fase S. Este evento impide la formación de los complejos de pre-replicación (pre-RC), lo que reduce la proliferación celular¹⁴⁷. En esta investigación han identificado dos posibles motivos posibles de reconocimiento para la ligasa SCFFBXW7 α (CPDs). Además se ha descrito que las ligasas de ubiquitina SCFFBXW7 α y SCF β TrCP pueden regular la estabilidad de un mismo sustrato, tanto cooperando como interfiriendo en la degradación del mismo¹⁴⁸. Su papel como oncogen se ha identificado en numerosos estudios. La sobreexpresión de PLK1 se ha encontrado en una gran variedad de cáncer como gliomas¹²⁰, tiroides¹⁴⁹, próstata¹⁵⁰ o mama¹⁵¹ entre otros y se ha asociado con peor pronóstico en cáncer en neuroblastomas y cáncer de ovario^{152,153}.

10. MCL1

MCL1 es una proteína antiapoptótica miembro de la familia BCL2 que previene la activación de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK¹⁵⁴. Estudios previos en nuestro grupo han demostrado la importancia de las interacciones Bcl-xL/Bak en la respuesta a paclitaxel en células de cáncer de mama³⁸. Además también hemos observado que los niveles de MCL1 son determinantes para que paclitaxel promueva la apoptosis en células de cáncer de próstata tras inducir una parada en mitosis¹⁵⁵. Por ende, la estabilidad de esta proteína es un factor clave que gobierna la supervivencia de la célula en mitosis. En este sentido, dos complejos de ubiquitina ligasas facilitan de manera simultánea la degradación de esta proteína. Por un lado, la fosforilación de MCL1 en Thr92 por el complejo ciclina B1-CDK1 promueve su ubiquitinización por APC/Cdc20 y posterior degradación por el proteasoma. Por otro lado, la fosforilación de MCL1 en Ser121/Glu125 y Ser159/Thr163 por GSK3 induce su degradación vía SCFFBXW7/proteasoma¹⁵⁶. Recientemente, varios estudios han demostrado

que esta interacción MCL1-FBXW7 parece estar implicada en la sensibilidad a los agentes antimetabólicos^{156,157}. Además, se ha descrito que en cáncer de ovario y líneas celulares T-ALL MCL1 juega también un papel fundamental en la adquisición de resistencia a agentes como bortezomib, un inhibidor del proteasoma, ya que se ha demostrado que niveles elevados de MCL1 correlacionan con baja respuesta en el tratamiento clínico antitumoral^{158,159}. Nuestro grupo también ha publicado recientemente que los carcinomas de próstata más agresivos presentan niveles elevados de esta proteína¹⁶⁰. Todas estas evidencias muestran a MCL1 como una posible diana terapéutica que podría sensibilizar al tratamiento con taxanos. Por este motivo, en esta tesis trataremos de comprobar si la inhibición de MCL1 permite revertir la resistencia a paclitaxel en células de cáncer de mama. Para ello, utilizaremos Obatoclax (GX15-070), un inhibidor específico del dominio BH3 de MCL1.

Obatoclax

Obatoclax mesilato, también conocido como GX15-070 se describe como una molécula BH3 mimética. Varios estudios han demostrado que en la membrana mitocondrial obatoclax se une a las proteínas de la familia Bcl-2, provocando la ruptura de las interacciones MCL1/BAK, lo que promueve la liberación de BAK, la permeabilización de la membrana mitocondrial y la posterior liberación del citocromo C induciendo la muerte celular¹⁶¹.

Ya desde 2006, ensayos clínicos en fase I/II habían probado la efectividad de obatoclax como agente individual o en combinación con otros fármacos en el tratamiento de leucemias, mieloma múltiple, linfoma y tumores sólidos dando resultados altamente prometedores^{162,163}. Este fármaco también ha mostrado efectividad como agente individual en células de cáncer de pulmón NSCLC o en combinación con cisplatino en tratamiento de cáncer de pulmón en estadio avanzado^{164,165}. Desde 2007, obatoclax, en combinación con docetaxel, topotecan o bortezomib, está siendo evaluado como inhibidor pan-BCL2 para el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento en melanomas¹⁶⁶. Además, ha demostrado efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama MCF7, MCF18 y MTR-13 en combinación con lapatinib y GW2974 (inhibidores de EGFR/HER2)¹⁶⁷, así como con ARA C en células de leucemia mieloide aguda (AML) y en cultivos primarios¹⁶¹. En 2011, Cephalon presentó los resultados clínicos en fase II, los cuales mostraron una reducción de los tumores sólidos en pacientes de cáncer de pulmón SCLC tras el tratamiento con obatoclax en combinación con bortezomib, carboplatino y etoposido. Estas terapias combinadas fueron bien toleradas, por lo que obatoclax se encuentra en la actualidad en ensayos de fase III¹⁶⁸.

A la vista de los resultados de todos estos ensayos y dado el importante papel de MCL1 en la respuesta a paclitaxel cabría preguntarse si la combinación con obatoclax podría aumentar la sensibilidad a paclitaxel. Por este motivo hemos estudiado si esta estrategia terapéutica podría ser útil para revertir la resistencia a paclitaxel.

11. Transición epitelio-mesénquima (EMT)

Dada la gran heterogenicidad del cáncer de mama y del microambiente tumoral *per sé* cada vez es más necesario estudiar los diversos mecanismos que llevan al desarrollo y a la progresión del cáncer. Además, como comentábamos anteriormente los tumores de mama poseen una alta capacidad para producir metástasis en ganglios linfáticos regionales y diseminarse a distancia.

En la última década, un cúmulo de evidencias ha mostrado que las células de tumores epiteliales pueden experimentar un cambio drástico que las convierte en células mesenquimales migratorias. Ahora, algunos investigadores creen que a esta conversión, conocida como transición epitelio mesenquimal, o EMT, se le puede atribuir la salida de células de tumores epiteliales de su residencia primaria en la mama, para diseminarse hacia el hígado, los pulmones o la médula ósea¹⁶⁹.

La EMT es en resumidas cuentas, un proceso por el cual las células epiteliales se transforman en células mesenquimales, lo que les permite migrar a través de la matriz extracelular¹⁷⁰. Aunque este proceso se puede activar durante el desarrollo tumoral^{171,172}, también es esencial durante la embriogénesis¹⁷³. Así pues, se han descrito tres tipos de EMT: tipo 1, que ocurre durante las etapas iniciales del desarrollo; tipo 2, asociada con procesos de cicatrización y regeneración tisular; y tipo 3, que se asocia a la progresión del cáncer y donde tras la invasión, las células tumorales pueden volver a recuperar su morfología epitelial (MET) para proliferar y desarrollar tumores en sitios distantes¹⁷⁴.

Durante el proceso de EMT, las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales como por ejemplo pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad e invasividad, resistencia a apoptosis, y cambios morfológicos. De igual modo, este complejo proceso involucra diversos factores de transcripción, proteínas de célula-superficie, proteínas del citoesqueleto y componentes de la matrix extracelular (ECM). Además, numerosas vías de señalización entre las que se incluyen Wnt/ β -catenina, TGF- β , Hedgehog y las vías de las integrinas tiene un papel crucial en la inducción de EMT^{173,175,176}.

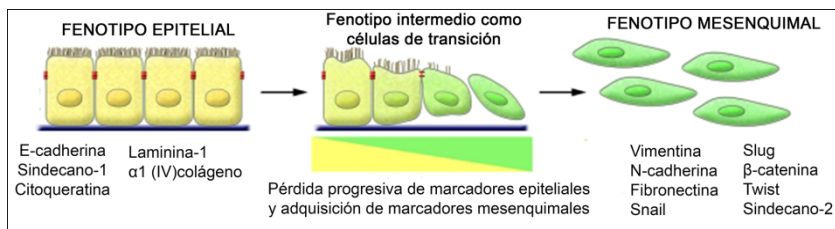


Figura 14. Representación esquemática de la transición epitelio-mesénquima (EMT). Adaptado de kalluri y Weinberg, 2009¹⁷⁰.

Entre los marcadores mesenquimales el incremento en la expresión de vimentina se utiliza con frecuencia como marcador de EMT en cáncer y se asocia con el fenotipo migratorio¹⁷⁷. Se ha publicado que la expresión de vimentina causa reorganización citoesquelética asociada a peor pronóstico y con tendencia al desarrollo de metástasis en cáncer de mama.

Por su parte, la adhesión celular y la polaridad del epitelio dependen de la formación de uniones celulares adherentes, en las que la E-cadherina es un determinante clave que proporciona la estructura física tanto para las uniones célula-célula como para el reclutamiento de complejos de señalización¹⁷⁸. Así pues, la pérdida de la función de E-cadherina es uno de los primeros pasos en la inducción de la EMT^{179,180}. En la actualidad, la caracterización de la regulación de E-cadherina durante el proceso de la EMT ha supuesto un avance importante en el conocimiento de los mecanismos moleculares que están envueltos en la pérdida de la adhesión celular y en la adquisición de propiedades migratorias durante la progresión de los carcinomas¹⁸¹.

En las células normales o no invasivas E-cadherina y β -catenina interactúan en las uniones adherentes y estrechas para mantener el fenotipo epitelial. Durante el proceso de EMT la vía Wnt/ β -catenina tiene también un papel importante ya que en la pérdida de adhesión celular, E-cadherina es endocitada y β -catenina puesta en libertad. Este evento favorece la translocación de β -catenina desde la membrana celular hasta el citoplasma donde se ubiquitina y degrada, o hasta el núcleo donde puede activar programas transcripcionales que determinan la movilidad mesenquimal y un fenotipo invasivo^{172,180}. En concreto, la β -catenina nuclear es un co-activador transcripcional con TCF/LEF-1, que controla la transcripción de SNAIL1 entre otros marcadores asociados con EMT¹⁷⁷. Recientemente se ha demostrado que LEF-1 actúa junto con β -catenina para promover la supervivencia celular y la proliferación durante el desarrollo de la glándula mamaria y en cáncer de mama¹⁸².

Entre los factores transcripcionales implicados, los miembros de la familia Snail (Snail, Slug y Twist) son considerados reguladores claves de este proceso¹⁸³. Recientemente se ha demostrado que de SNAI2 (Slug) se

encuentra sobreexpresado en las células MCF7 resistentes a paclitaxel¹⁸⁴, y además previamente ya se había asociado la expresión de estos genes a resistencia a doxorubicina¹⁸⁵.

Además de la vía Wnt, el factor de crecimiento tumoral TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) también regula el proceso de TEM a través de diferentes mecanismos^{172,173,175,176}. Por un lado, la familia de ligandos del TGF- β se une normalmente al receptor TGF- β 2, que recluta y fosforila al receptor TGF- β 1. Este último fosforila a su vez a los receptores Smad (R-Smad) lo que permite que se puedan unir a la proteína coSMAD. Los complejos R-SMAD/coSMAD se acumulan en el núcleo celular donde actúan como factores de transcripción y participan en el control de expresión de determinados genes mesenquimales y la represión de genes epiteliales¹⁸⁶. Por otro lado, la señalización TGF- β activa a la quinasa de unión a integrina (ILK) que fosforila a GSK3 β y a AKT (proteína quinasa serina/treonina) con la consiguiente traslocación nuclear de β -catenina y la activación de diferentes factores de transcripción involucrados en EMT¹⁸².

Asimismo, el potencial invasivo y metastásico de las células cancerosas está modulado por una serie de ligandos extracelulares provenientes desde la EMC y que además, pueden controlar la proliferación celular, la dinámica del citoesqueleto, la apoptosis y la expresión génica. Muchas de estas acciones son mediadas por un conjunto de moléculas denominadas moléculas de adhesión celular (MAC). Éstas son proteínas de membrana que actúan como un enlace entre el exterior y el interior de la célula. Dentro de las MAC podemos encontrar cinco familias: cadherinas, proteoglicanos, inmunoglobulinas, integrinas y selectinas¹⁸⁷. A continuación describiremos brevemente algunas de estas moléculas que son importantes en nuestro estudio.

SPOCK1 (del inglés *SPARC/osteonectin, cwcv, and kazal-like domain proteoglycan 1*)

También conocido como Testican-1 se identificó por primera vez en plasma seminal humano como un gen que codifica el núcleo de glicoproteínas de proteoglicano condroitin/heparan sulfato¹⁸⁸. Spock1 pertenece a la familia SPARC¹⁸⁹ por lo que comparte una estructura similar a otros miembros como por ejemplo SPARC (osteonectina) y juega un papel crucial en la proliferación celular, la adhesión célula-célula y migración¹⁹⁰.

Aunque inicialmente se consideró que SPOCK1 podría contribuir al enriquecimiento en proteoglicanos de la matriz extracelular en el cerebro y desempeñar un papel importante en la neurogénesis, los estudios más recientes lo describen como un novedoso oncogen que podría estar involucrado en el desarrollo y progresión del cáncer¹⁸⁹. Además se le atribuye

un papel crucial en la supervivencia y proliferación de células tumorales de cerebro^{188,191}.

Sindecano 2 (SDC 2)

Los sindecanos son proteínas transmembrana que pertenecen a la familia de proteoglicanos, y funcionan como receptores de superficie en la regulación de transducción de señales, adhesión celular, migración y organización del citoesqueleto¹⁹². De acuerdo a sus secuencias aminoacídicas los sindecanos se dividen en dos subfamilia, una formada por los sindecanos -1 y -3 y otra por los sindecanos -2 y -4. La mayoría de las células expresa combinaciones distintas de los cuatro sindecanos a medida que se diferencian. Así, el sindecano-1 se expresa típicamente en células epiteliales, el sindecano-3 en células neuronales¹⁹³, el sindecano-2 se encuentra principalmente en células mesenquimales, y el sindecano-4 es ubicuo¹⁹⁴.

Diversos estudios han descrito que en células de cáncer de colon el sindecano-2 media la adhesión y proliferación y su expresión induce un fenotipo migratorio¹⁹⁵.

Integrinas

Constituyen una familia de moléculas de adhesión transmembrana que participan en las interacciones entre las células y la matriz extracelular, lo que les confiere un papel crucial en la adhesión celular y la migración. Están compuestas por subunidades α y β , que además de unir diversos cationes divalentes, interactúan entre sí de manera no covalente para formar heterodímeros. Existen 18 unidades α y 8 β que se combinan para dar lugar a 24 integrinas diferentes. A pesar de que el tipo de ligando que se une a la integrina viene dado por el tipo de subunidades α y β , muchas integrinas se unen a más de un ligando y algunos de estos ligando se unen a más de una integrina, usando el mismo o distinto sitio de reconocimiento¹⁹⁶. Entre los múltiples ligandos se encuentran proteínas de matriz extracelular como fibronectina, vitronectina, colágeno, laminina o fibrinógeno¹⁹⁷. La unión de estas moléculas a las integrinas induce numerosas cascadas de señalización que controlan la polaridad celular, motilidad, supervivencia, proliferación y diferenciación.

Los análisis funcionales y estructurales de las integrinas han permitido identificar secuencias de reconocimiento de ligando como por ejemplo la secuencia RGD (tripéptido formado por Arg-Gly-Asp), que aunque originariamente se identificó como el motivo de unión de la fibronectina, en la actualidad se ha demostrado que es una secuencia de reconocimiento común en numerosos ligandos¹⁹⁶. De hecho, las integrinas que reconocen ligandos que contienen domino RGD han recibido mayor atención ya que se ha demostrado su expresión en células tumorales y varios tipos de tumores

sólidos. Además su contribución al crecimiento tumoral, diseminación metastásica, diferenciación de células endoteliales y en la angiogénesis ha sido ampliamente estudiada. Por ejemplo, se ha demostrado que células tumorales de cáncer de mama expresan integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ que están involucradas en la adhesión de varias moléculas de matriz extracelular¹⁹⁷. En concreto la integrina $\alpha V\beta 3$ parece tener un papel crucial en la metástasis cerebral en cáncer de mama¹⁹⁸.

En la actualidad, entre los agentes desarrollados para la inhibición de la activación de las integrinas se encuentra Cilengitide (EMD 121974), un pentapéptido cíclico que se basa en la secuencia RGD y e inhibe la interacción de los ligandos a las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ ¹⁹⁹. Actualmente cilengitide se encuentra en fase clínica III para el tratamiento de glioblastomas donde parece actuar inhibiendo la angiogénesis y la invasión y proliferación y en fase II para el tratamiento de otros tumores^{200,201}.

Se sabe además que la molécula de adhesión EDIL3 es un ligando de de las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ y componente de la ECM²⁰². En esta tesis estudiaremos el potencial papel de EDIL3 en la resistencia a taxanos y su relación en el fenómeno TEM, por ello describiremos a continuación algunas de sus características.

12. EDIL3

EDIL 3 (del inglés *EGF like repeats and discoidin domains 3*) también conocido como DEL-1 (del inglés *developmental locus endothelial-1*) es una proteína de matrix extracelular que se aisló e identificó, por primera vez, en 1998 de pulmones de embriones de ratón. Esta glicoproteína se compone de cinco dominios: tres repeticiones parecidas al factor de crecimiento epidérmico (EGF) llamados E1, E2 y E3 y dos dominios discontinuo *I-like* (C1, C2). El segundo dominio EGF contiene un motivo RGD que permite su interacción con integrinas. Parece que el C-terminal del dominio C1 es esencial en la disposición de EDIL3 en la matriz extracelular, mientras que tanto los dominios E como el N-terminal del dominio C1 sirven de apoyo en esta estructura^{203,204}.

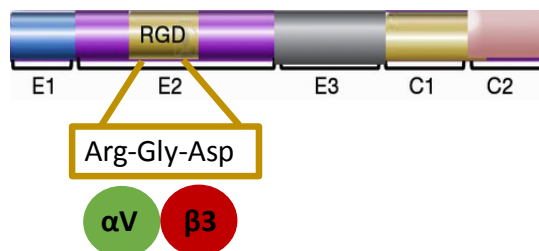


Figura 15. Esquema de la estructura de de la glicoproteína EDIL3. Se muestran tres repeticiones EGF-like (E1, E2 y E3) y dos dominios discontinuos I-like (C1 y C2). La segunda repetición EGF

contiene un dominio RGD (Arg-Gly-Asp) que permite la interacción con la integrina $\alpha\beta3$. Adaptado de Calvisi DF et al., 2016²⁰⁵

Múltiples evidencias han demostrado que la expresión de EDIL3 es variable en los diferentes tejidos, concretamente en humanos adultos se expresa en cerebro, corazón, intestino delgado y riñón²⁰⁶. También se han publicado algunos estudios relacionados con la función de esta proteína en cáncer aunque pocos relacionados con cáncer de mama. Por ejemplo se ha demostrado que EDIL3 se expresa en líneas celulares tumorales y en múltiples tumores primarios como en pulmón²⁰⁷, vejiga²⁰⁸, páncreas²⁰⁹, hígado²¹⁰, mama²¹¹, cáncer de colon y melanomas²⁰⁶. Además los niveles de EDIL3 se han asociado con peor pronóstico y progresión de cáncer de pulmón²⁰⁷, cáncer de vejiga²⁰⁸ y adenocarcinoma pancreático ductal²¹⁰. Recientemente EDIL3 ha sido identificado como un novedoso biomarcador aislado de plasma de pacientes de vesículas extracelulares en la detección del cáncer de mama en estadios iniciales^{211,212}.

Funciones

Una de las primeras funciones que se atribuyeron a EDIL3 es su papel en la morfogénesis vascular ya que es secretado por células embrionarias endoteliales y condrocitos hipertróficos^{204,213}. Por ello, se considera un potente factor pro-angiogénico, que contribuye de manera significativa a la remodelación y desarrollo de la pared vascular durante la angiogénesis²¹⁴. Además, juega un papel importante en la respuesta inmune e inflamatoria, concretamente actúa como un factor anti-adhesivo que interfiere con la integrina LFA-1 y previene la adhesión de leucocitos al endotelio²¹⁵.

Entre sus funciones también destaca su papel como mediador de la adhesión de las células endoteliales y de la migración²⁰⁶, principalmente a través de su interacción con la integrina $\alpha\beta3$. Los datos sugieren que EDIL3 se secreta a través de la cara abluminal de las células endoteliales y se deposita en la matrix extracelular²⁰⁵. Este hecho permite que se comporte como un ligando soluble que debe interaccionar con los receptores de las integrinas para que tenga lugar la señalización hasta las células endoteliales. A modo de resumen, EDIL3 se une a la integrina por su dominio RGD y previene la apoptosis en las células endoteliales, lo que favorece la vascularización del tumor y potencia la proliferación de las células cancerosas y la invasión. Este efecto es mediado especialmente a través de la comunicación cruzada con la señalización FAK/ERK y AKT²¹⁶. La interacción del dominio RGD con la integrina $\alpha\beta3$ induce la fosforilación de diferentes moléculas involucradas en la señalización celular como p125FAK y MAP kinasas²¹⁷. En este sentido se ha identificado a EDIL3 como un novedoso regulador de la EMT en células de hepatocarcinoma. Además recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de EDIL3, regulada por la bajada de expresión de miR-137

desencadena la activación de ERK y TGF- β a través de la interacción con la integrina $\alpha\text{v}\beta^3$ ²⁰⁵.

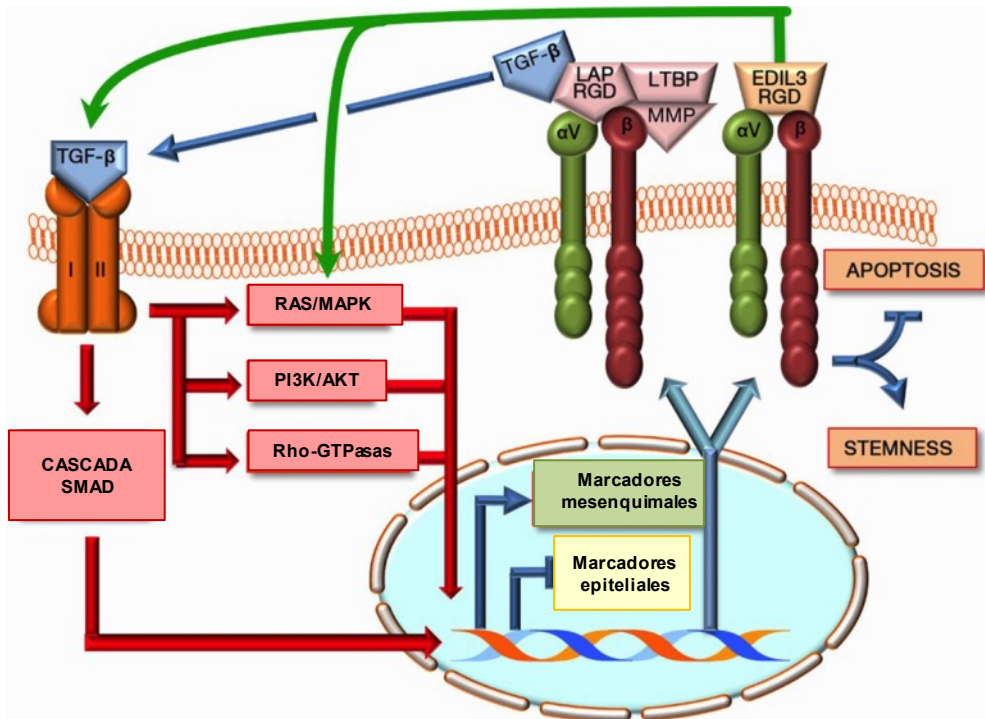


Figura 16. Funciones de EDIL3. La interacción de proteínas ECM, EDIL3 y la proteína LAP del complejo TGF- β inmaduro con la integrina $\alpha\text{v}\beta^3$ da lugar a la activación de las vías de señalización TGF- β , RAS/ERK, PI3K/AKT y Rho/GTPasas. Estos eventos producen el aumento de regulación de marcadores mesenquimales, la disminución de marcadores epiteliales y el aumento de regulación de integrinas con el consiguiente descenso de la muerte celular y la adquisición de cambios morfológicos y moleculares de *stemness* y EMT. LAP péptido de latencia activado, LTBP proteína 1 de unión al factor de crecimiento transformante β latente, MMP metaloproteasa. Adaptado de Calvisi DF et al., 2016²⁰⁵.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La hipótesis general de esta investigación doctoral es que el análisis de mecanismos de resistencia a taxanos permitirá el desarrollo y el uso efectivo de los agentes quimioterápicos que evitarán la resistencia y la consiguiente recurrencia y metástasis del cáncer de mama. Esta expectativa global se va a concretar en las tres hipótesis específicas siguientes:

- A.** La degradación de proteínas por el sistema ubiquitina de proteasoma es el principal mecanismo de regulación de la progresión del ciclo celular. La falta de regulación en su expresión o mutaciones en los componentes de este sistema proteolítico, o en sus sustratos, podrían influir en el proceso de tumorigénesis y convertirse en dianas potenciales para terapias antitumorales. En concreto, se propone que SCF^{FBXW7} podría estar implicado en el mantenimiento del control de mitosis e inducción de apoptosis tras tratamiento con paclitaxel a través del control de la degradación de algunos de sus sustratos.
- B.** MCL1 tiene un papel importante en la muerte apoptótica durante la mitosis por lo que planteamos que el tratamiento con inhibidores de MCL1 podría ser efectivo como estrategia terapéutica que favorezca la sensibilización a paclitaxel.
- C.** Determinados genes juegan un papel importante en la progresión del cáncer de mama en humanos y su expresión está asociada con la enfermedad agresiva y, por lo tanto, pueden ser una diana novedosa y efectiva en el tratamiento del cáncer de mama. Concretamente, se propone que cambios en la expresión de determinados genes como EDIL3 podrían estar implicado en la posible activación del proceso de transición-epitelio mesénquima (EMT) como un mecanismo generado en la resistencia a taxanos.

OBJETIVOS

Atendiendo a las consideraciones anteriores los objetivos de este estudio son los siguientes:

1. Estudiar la expresión y el papel funcional de FBXW7 y sus sustratos en células de tumorales de mama sensibles y resistentes a paclitaxel.
2. Analizar la expresión de FBXW7 y algunos sustratos importantes en varias colecciones de muestras clínicas de pacientes con cáncer de mama para establecer correlaciones con la progresión tumoral, evolución clínica y respuesta al tratamiento con paclitaxel.
3. Ensayar el fármaco obatoclax, dirigido a la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, como posible agente sensibilizador de resistencia adquirida tras la administración de paclitaxel.
4. Ahondar en los mecanismos de resistencia que adquieren las células tumorales ante tratamientos prolongados con paclitaxel mediante el análisis de la expresión génica diferencial entre células sensibles o resistentes a paclitaxel y su vínculo con la respuesta a taxanos en el cáncer de mama.
5. Analizar la expresión de EDIL3 en células de cáncer de mama y estudiar el papel de EDIL3 sobre la EMT en relación al tratamiento con taxanos.
6. Buscar nuevas estrategias terapéuticas que permitan la sensibilización a paclitaxel en células tumorales de mama.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SKBR3 y BT-474 se obtuvieron de la colección de células de Interlab Cell Line Collection (Génova, Italia). Todas las líneas se cultivaron de manera rutinaria en RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biochrome, Millipore), 50U/mL de penicilina y 50 µg/mL (Sigma), 10 mmol/L de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxil)1-piperizine-etanosulfónico) (Gibco) y 1mM de glutamina (Gibco), en un incubador humificado a 37°C y 5% de CO₂.

Generación de la línea resistente MDA-MB-468R

Las células MDA-MB-468 se cultivaron adicionando al medio de cultivo paclitaxel a una concentración de 4nM durante 2 meses. A continuación, se seleccionaron aquellos clones que se mantuvieron viables y se redujo la concentración de paclitaxel a la mitad para mantener las células en estas condiciones durante un mes. Posteriormente, se redujo la concentración de paclitaxel a 1nM y se continuó con el cultivo de las células durante 30 días. Finalmente, las células viables se cultivaron sin adición de paclitaxel durante un mes más. A la línea resistente generada se le denominó MDA-MB-468R.

Tripsinización

Los cultivos se mantuvieron en subconfluencia mediante la dilución periódica por tripsinización. Para ello, las células, todas adherentes, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; Sigma) y a continuación se añadió una solución estéril de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.05% (Lonza). Posteriormente, se incubaron a 37°C durante el tiempo mínimo necesario para despegar las células, que varió en función de la línea celular. A continuación, la reacción de tripsina se neutralizó añadiendo un volumen de medio suplementado cuatro veces superior al del volumen de tripsina adicionado. Finalmente, la células se centrifugaron 5 minutos a 1800 rpm, se resuspendieron en medio de cultivo suplementado y se sembraron de nuevo en frascos de cultivo.

Congelación y descongelación de células

El medio de los cultivos celulares subconfluentes se cambió por nuevo RPMI suplementado entre 4-6 horas antes de la congelación de las células. Transcurrido ese tiempo, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en 1.5 mL de medio de congelación para obtener 5x10⁶ células/criotubo. Los criotubos se mantuvieron 45 minutos a 4°C, a continuación 24 horas a -80°C y, finalmente, se guardaron en una atmósfera de nitrógeno líquido.

Las células se descongelaron mediante el traslado de los criotubos desde nitrógeno líquido hasta un baño a 37°C en agitación hasta prácticamente la descongelación total de las células. A continuación, se resuspendieron en medio de cultivo suplementado, se sembraron en frascos de cultivo y finalmente, se incubaron a 37°C y a 5% de CO₂.

Tratamiento con fármacos

Las soluciones de todos los fármacos se prepararon a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), se alicuotaron y se conservaron a -20°C.

Para los experimentos de citometría celular o análisis de proteínas mediante *Western blot* fue necesario tratar los cultivos celulares con los fármacos mostrados en la tabla 5.

Tabla 4. Fármacos utilizado para los ensayos de ciclo celular y *Western blot* .

Fármaco	Casa Comercial	Uso	Concentración usada en las líneas celulares	
Paclitaxel	Calbiochem	Estabilizador de microtúbulos	MDA-MB-468	0.025µM
			MDA-MB-468R	0.025µM
			MCF7	0.025µM
			MDA-M-231	1µM
Obatoclax	Selleck Chemicals	Inhibidor familia Bcl-2 (MCL1)	MDA-MB-231	1µM
Cilengitide	Selleck Chemicals	Inhibidor de integrina	MDA-MB-231	1 µM

Se detallan los fármacos, la casa comercial, el uso clínico y la concentración utilizada en cada una de las líneas celulares para los ensayos de ciclo celular y *Western blot* .

Las células se sembraron en subconfluencia y se incubaron durante 24 h para permitir su adhesión. A continuación, se añadió 0.1%v/v de DMSO a las células usadas como control y los diferentes fármacos o combinaciones indicadas en cada caso. Para los tratamientos secuenciales se adicionó el primer fármaco y transcurridas 8 h se añadió el segundo tratamiento hasta completar el tiempo final de 24 ó 48 h.

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizó paclitaxel, obatoclax y cilengitide en un rango de concentraciones de 1×10^{-04} hasta 100 µM en las líneas celulares donde se estudiaron.

Ensayos de citotoxicidad

Se plaquearon 6×10^3 células/pocillos para las líneas MDA-MB-468 Y MDA-MB468R y 1×10^4 células/pocillos para la línea celular MDA-MB-231, en crecimiento exponencial, en placas de 96 pocillos (Nunc). La cantidad celular óptima se calculó previamente mediante curvas de dilución de las diferentes líneas celulares. Tras la adhesión celular (crecimiento de 24 h), se adicionó medio que contenía diferentes concentraciones de fármacos y sus combinaciones en pocillos por triplicados. Se realizaron diluciones seriadas para poder abarcar el rango de dosis apropiado para el análisis. Las células se expusieron al fármaco durante 72 h y el ensayo de viabilidad se realizó usando AlamarBlue Cell Viability Assay Reagent (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El reactivo AlamarBlue se adicionó al 10% del volumen del pocillo y se incubó a 37°C durante 4 h. A continuación, se midió la fluorescencia con FLx800 Microplate Fluorescence Reader (Bio-Tek) a una longitud de onda de excitación de 545 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

Los datos se normalizaron con el tratamiento vehículo DMSO y la concentración inhibitoria media IC50 se calculó usando Prism 4.0 software (GraphPad) y OriginPro8.

ARN de interferencia (siRNA)

Para los ensayos de silenciamiento génico transitorios se utilizaron *pools* validados de FBXW7 α -, MCL1-, PLK1-, EDIL3- siRNA y siRNA control negativo obtenidos de GE Dharmacon (ON-TARGETplus SMART pools L-004264, L-004501, L-003290, L-017593 y D-001810). Las transfecciones se llevaron a cabo usando el reactivo DharmaFECT 2 (GE Dharmacon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los siRNA se usaron a 50 nM. Las células se sometieron a los diferentes tratamientos tras 24 h de silenciamiento.

Plásmidos utilizados

Los plásmidos pCMVHA y pCMVHA-FBXW7 fueron cedidos por el Dr. Francisco Romero (Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España). La construcción del plásmido pCMHVA-FBXW7 queda descrita en la tesis doctoral del Dr. Servando Giráldez y en el artículo publicado por el mismo autor¹⁴⁷.

Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo usando el reactivo FuGENE (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se trataron con DMSO o paclitaxel 24 h después de la transfección.

Análisis de proteínas mediante *Western blot*

Tras someter a las células a diferentes tratamientos, éstas se tripsinizaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. A continuación, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS. De nuevo, la células se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, se volvió a retirar el sobrenadante y se homogenizaron en tampón de lisis NonidetP-40 (NP-40) e inhibidores de proteasas (Sigma) y fosfatasas (Roche) pipeteando varias veces y manteniendo en rotación durante 1h a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron 30 minutos a 12000 rpm a 4°C. La concentración de proteínas de los lisados se cuantificó mediante ensayo colorimétrico usando el método BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. La medida de la absorbancia se realizó en el espectrofotómetro Pharmacia—Lkb Ultrospec III y los valores obtenidos se analizaron con el programa informático Prism 4.0 software (GraphPad).

La desnaturalización de las proteínas se realizó mediante la adición de tampón de carga Laemmli 1X y posterior calentamiento de las muestras a 98°C durante 5 minutos. Para la separación de las proteínas se emplearon entre 10-20 µg de las mismas que, junto a varios patrones de pesos moleculares (BioRad o Amersham), se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 8%. La migración se realizó a 110 mV, y se utilizó tampón Tris-glicina 1X como electrolito. Seguidamente, se realizó la electro-transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare) usando tampón de transferencia y aplicando un voltaje constante de 100 V durante 90-120 minutos en cubetas de BioRad. Con el fin de visualizar si la carga de las proteínas era comparable, las membranas se incubaron con solución rojo Ponceau S 1X durante 5 minutos en agitación y posteriormente se lavaron con agua.

Para la inmunodetección, las membranas se mantuvieron en agitación suave con tampón de bloqueo 1X (Blocking Reagent, Roche) durante una hora a temperatura ambiente que permitió bloquear los sitios de unión inespecíficos. A continuación, se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario específico preparado a la dilución apropiada en el tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se sometieron a dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave con tampón tris salino (TBS)-Tween 20. Seguidamente, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, cabra anti-ratón o cabra anti-conejo (ECL™ anti-mouse IgG o ECL™ anti-rabbit IgG, GE Healthcare) diluidos en tampón de bloqueo (1:20000) durante una hora, a temperatura ambiente y agitación suave. Tras la incubación, se realizaron de nuevo dos lavados de 15 minutos con tampón tris salino (TBS)-Tween 20, y

se les añadió la solución ECL Prime (Amersham™ ECL™ Prime *Western blot* t chemiluminescence detection system, GE Healthcare) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Para la detección de la señal por quimioluminiscencia se utilizaron películas de autorradiografía (Amersham™ Hyperfilm™ – ECL, in Detection Reagent, GE Healthcare) y las soluciones de revelado (Developer D-19, KODAK) y fijación (Radip Fixer, ILFORD). Por último, las placas autorradiográficas se escanearon para su cuantificación.

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y el análisis densitométrico se realizó con el programa informático ImageJ (ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>)). Las unidades arbitrarias densitométricas de las proteínas de interés se corrigieron utilizando β -actina como control de carga. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático Prism 4.0 software (GraphPad). El análisis de las diferencias entre dos condiciones se realizó mediante el test *t de Student* de muestras pareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativo cuando $p < 0.005$.

Anticuerpos utilizados para *Western blot*

La siguiente tabla (tabla 6) muestra los anticuerpos y las condiciones usados para *Western blot* :

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para *Western blot* .

Anticuerpo	Casa comercial	Peso molecular	Clonicidad	Dilución
Anti-AURKA	Novus	45 kDa	Conejo policlonal	1:2000
Anti-β-actina	Sigma	46 kDa	Ratón monoclonal	1:20000
Anti-BubR1	Bethyl	125 kDa	Conejo policlonal	1:3000
Anti-CASP-9 activa	Cell Signaling	35 kDa	Conejo policlonal	1:500
Anti-CASP-3 activa	Cell Signaling	19-17 kDa	Conejo policlonal	1:500
Anti-CiclinaB1	Santa Cruz	60 kDa	Conejo policlonal	1:1000
Anti-Ciclina E	Monosan	50 kDa	Ratón monoclonal	1:500
Anti-E-cadherina	BD Bioscience	120 kDa	Ratón monoclonal	1:5000
Anti-Edil3	Thermo Fisher Scientific	54 kDa	Conejo policlonal	1:1000
Anti-HA peroxidasa	Roche		Rat monoclonal	50mU/mL
Anti c-Myc	Sigma	65 kDa	Conejo policlonal	1:1000
Anti-FBXW7	Novus	100 kDa	Conejo policlonal	1:500
Anti-MCL1	Santa Cruz	40 kDa	Conejo policlonal	1:1000
Anti-PARP	BD Bioscience	116-85 kDa	Ratón monoclonal	1:500
Anti-p-HistonaH3 ^{5er10}	Santa Cruz	15 kDa	Conejo policlonal	1:1000
Anti-PLK1	Millipore	64 kDa	Ratón monoclonal	1:10000
Anti-PTTG1	Santa Cruz	29 kDa	Ratón monoclonal	1:1000
Anti-Slug	Cell Signaling	30 kDa	Conejo policlonal	1:1000
Anti-Spock1	Santa Cruz	49 kDa	Ratón monoclonal	1:500
Anti-vimentina	Millipore	57 kDa	Ratón monoclonal	1:1000

Se detallan los anticuerpos usados, casa comercial, peso molecular de la proteína a la que va dirigido, clonicidad y dilución usada para *Western blot* .

Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo

Después de someter a las células a diferentes tratamientos, se tripsinizaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. A continuación, las células se resuspendieron en PBS y se fijaron en etanol al 70% durante una hora a 4°C. De nuevo se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm, se realizaron dos lavados en PBS y se incubaron con una solución de RNasa A 0.2 mg/mL (Sigma) a 37°C durante 1 hora. Para el marcaje de células, se añadió 5µl de yoduro de propidio 1mg/mL (Sigma) y finalmente se incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad.

En algunas ocasiones, principalmente en aquellos experimentos en los que se realizó silenciamiento y transfección génica, se utilizó el kit CycleTest Plus DNA reagent kit (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para analizar el contenido de DNA se utilizó el citometro de flujo (FACScan, BD Biosciences) y los programas informáticos CellQuestPro (BD Biosciences) y ModFit LT2 (Verity Software) permitieron la adquisición de datos y la cuantificación de los porcentajes de células, respectivamente.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Tras el tratamiento con diferentes fármacos, las células se tripsinizaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, se resuspendieron en PBS y se realizaron improntas celulares sobre portaobjetos silanizados. A continuación, se fijaron en metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 10 minutos a -20°C y se secaron al aire. Los portaobjetos se sumergieron durante 30 minutos en una solución de citrato sódico salino (SSC) 2x/NP40 0.3% a 37°C, se deshidrataron en una serie gradada de alcoholes (70%, 80% y 96%) y se secaron nuevamente. Sobre las improntas se añadió la mezcla de sondas centroméricas para los cromosomas 1, 11 y/o 17 (Vysis y Kreatech) y tras sellar la zona de hibridación con cubreobjeto y adhesivo (Fixogum Rubber Cement, Marabu) se incubaron a 72°C durante 5 minutos para llevar a cabo la co-desnaturalización del ADN celular y las sondas. La hibridación se realizó en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos y se realizó un lavado post-hibridación en SSC 2x/NP40 0.3% durante 5 minutos a 72°C. A continuación, los cristales se introdujeron en una solución de PBD 1X (Detergente en tampón fosfato, MP Biomedicals) durante 5 minutos a temperatura ambiente y previo secado se realizó una contratinción con DAPI/antifade. Finalmente, se procedió a la visualización de las señales de la sonda mediante un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados y con una cámara digital (Leica, Wetzlar, Germany).

Se contabilizó el número de señales para los cromosomas en al menos 100 células de cada condición. Por último, se calculó el porcentaje de células con ploidía basal y el porcentaje de células con ploidía superior a la basal en cada caso.

Muestras y datos de pacientes

Los estudios realizados con los datos y muestras de pacientes se aprobaron por el Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Estudio 1. Se seleccionaron 296 muestras de pacientes con carcinoma de mama invasivo obtenidos de pacientes diagnosticados entre Julio de 2004 y Julio de 2007 en el Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España. Los pacientes se sometieron a diferentes tratamientos clínico. Se construyó una matriz de estas muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina.

Estudio 2. Se seleccionaron 85 pacientes con cáncer de mama (estadio T1-T3) sometidos a una cirugía paliativa y nodo negativos. Los pacientes se trataron con 5-fluorouracilo, epirubicina, ciclofosfamida (FEC) o FEC más paclitaxel (FECp). El tratamiento en el grupo FEC consistió en 6 ciclos de 21 días con FEC (5-fluorouracilo a 600 mg/m² de superficie corporal, epirubicina a 90 mg/m² y ciclofosfamida 600 mg/m², administrado por vía intravenosa). El tratamiento del grupo FECp consistió en 4 ciclos de 21 días con FEC, y 3 semanas después se administraron 8 ciclos de 7 días de paclitaxel a 100 mg/m² a través de una infusión intravenosa de 60 minutos. Se realizó el seguimiento de estos pacientes para valorar el tiempo libre de enfermedad, que se definió como el tiempo desde la aleatorización de los datos hasta una recaída clínica, un segundo cáncer o muerte, cualquiera de los acontecimientos que ocurriera antes. Las muestras de los tejidos se fijaron con 10% de formol en bloques de parafina.

Inmunohistoquímica

Las secciones de 5 μ de los bloques de parafina con los matrices de tejidos de cáncer de mama se desparafinaron en xilol, y posteriormente se rehidrataron en una serie gradada de alcoholes. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena introduciendo las secciones en una solución acuosa de H₂O₂ al 3% durante 30 minutos y, después se bloquearon los sitios de unión inespecíficos incubando con tampón de bloqueo (reactivo de bloqueo al 1%, Roche) en 0,05% de Tween 20-PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se realizó la recuperación antigénica en microondas utilizando tampón EDTA 1mM pH 9,0 (Dako). Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (tabla 7). Tras varios lavados en tampón Tris 0.05M, se incubaron

con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (EnVision™ Preoxidase-labelled polymer-linked secondary antibodies, DakoCytomation). La visualización de la inmunoreacción se realizó usando 3,3'-diaminobezidina (3,3'-DAB) como sustrato cromogénico de la peroxidasa (DAB Buffered Substrate y EnVision™ Flex DAB+Chromogen, Dako). El siguiente paso fue la contratinción de las secciones de hematoxilina y el montaje en DPX (BDH Laboratories). La evaluación de la expresión de las distintas proteínas en los tejidos se realizó por dos patólogos de manera independiente en al menos 10 campos de acuerdo con el grado de tinción de las células cancerosas y clasificando su expresión en baja (si menos del 25% de las células estaban teñidas intensamente) o moderada/alta (si más del 25% de las células tumorales estaban teñidas intensamente).

Tabla 6. Anticuerpos usados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Casa comercial	Localización celular	Clonicidad	Dilución
Anti-AURKA	Novus	Citoplasma	Conejo policlonal	1:700
Anti-Ciclina E	Monosan	Nucleo	Ratón monoclonal	1:100
Anti-FBXW7	Novus	Nucleo	Conejo policlonal	1:2000
Anti-MCL1	Santa Cruz	Citoplasma	Conejo policlonal	1:1250
Anti-PLK1	Millipore	Núcleo y citoplasma	Ratón monoclonal	1:1000

Se detallan los anticuerpos usados, casa comercial, localización celular, clonicidad y dilución usada.

Análisis estadístico

Las correlaciones entre la expresión de las proteínas y las variables clinicopatológicas se analizaron mediante el test χ^2 usando el programa informático Prism 4.0 software (GraphPad). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Las curvas de tiempo libre de enfermedad se calcularon mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante el log-rank de Mantel-Cox. Para estos análisis estadísticos se utilizaron los programas informáticos Prism 4.0 (GraphPad) y el programa SPSS (IBM). En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Estudio comparativo de los perfiles de expresión

Para los estudios de expresión génica global se usó el análisis de *microarray* s de DNA de alta densidad de la plataforma de *Affymetrix*. Un *microarray*

consiste en un gran número de secuencias cortas de ADN llamadas oligonucleótidos o sondas inmovilizadas sobre una superficie sólida. La tecnología desarrollada por *Affymetrix* utiliza *microarray s* de síntesis donde las sondas son sintetizadas directamente sobre un soporte o matriz de cuarzo de apenas 1.28 cm² que permite fijar hasta 5.5 millones de sondas diferentes. Su superficie está formada por miles de micro celdas, de modo que a cada una de ellas se les denomina *probe cell* y contiene alrededor de 10 millones de copias sintetizadas de una misma sonda. Al conjunto de todas las sondas que pertenecen al mismo gen se le denomina *probeset*.

Las células MDA-MB-468 y MDA-MB-468R se trataron con DMSO o 0.025 μM de paclitaxel durante 48 h. Seguidamente las líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-468R se tripsinizaron para la extracción de ARN con RNeasy Micro Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron tres réplicas de ARN de cada condición que procedían de tres cultivos celulares diferentes llevados en paralelo para cada línea celular. La cuantificación de los ARNs realizó con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000).

A continuación, el análisis de la calidad de las muestras de ARN para el *microarray* se realizó con 2100 Bioanalyzer de Agilent Technologies. Su software incorpora un algoritmo denominado RIN (*RNA Integrity Number*) que permite determinar la calidad de las muestras de ARN eucariótico total en base a un rango numérico (de 1 a 10), siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. Para la realización de un chip de *Affymetrix* el RIN debe estar comprendido entre los valores 8-10. Todas las muestras mostraron valores dentro de este rango.

Se realizó un estudio comparativo de los perfiles de expresión mediante el chip *Gene 1.0 ST Human Array de Affymetrix* en el centro Neocodex. En este estudio se analizaron las células MDA-M-468 tratadas con DMSO y paclitaxel y la línea MDA-MB-468R tratada con DMSO. El análisis se realizó sobre 3 réplicas de cada condición experimental. El chip incluía 32.321 sondas diferentes que proporcionaban información de expresión sobre 28.869 genes.

En el servicio de Genómica y Secuenciación del Instituto de Biomedicina de Sevilla se realizó un segundo estudio de *microarray* empleando *Primeview de Affymetrix* que contenía 49495 sondas para los genes anotados en la base de datos *RefSeq*. En este estudio se analizaron las células MDA-MB-468 y MDA-M-468R tratadas con DMSO.

Finalmente, la empresa CAEBI analizó los resultados obtenidos de ambos *microarray s*. Los resultados se procesaron con los programa Transcriptome

Analysis Console (TAC) y Expression Console de *Affymetrix* para el análisis primario (control de calidad y normalización) de los chips de expresión. Las matrices se procesaron a nivel génico con el algoritmo RMA (Robust Multichip Analysis) que aplica una normalización por cuantiles, y una corrección de fondo general, y somete las señales de intensidad de expresión a transformación logarítmica. Los valores normalizados y transformados de señal de expresión de cada uno de los genes y controles se basaron en la versión 19 del genoma humano.

En el análisis de los resultados del *microarray* se valoraron dos parámetros, por un lado el *fold change* (FC), que representa la cantidad de cambio en la expresión de los genes entre los casos estudiados y, por otro lado, el *p-value*, con una corrección FDR (*False Discovery Rate*) para test múltiple. Se consideraron significativos los cambios de expresión que presentaron $FC > |2|$ y $p\text{-value} \leq 0.05$.

PCR cuantitativa (qPCR)

Se procedió a la extracción de ARN mediante el kit de extracción AllPrepR DNA/RNA/miRNA (Quiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA aislado se cuantificó con NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher). A continuación, la obtención de cDNA se realizó mediante la transcripción reversa de 1 µg de ARN de las muestras con SuperScript® III (Invitrogen) y primer oligo (dT) (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta mezcla se sometió a un termociclador a un programa de:

Para la realización de la qPCR a tiempo real de los genes candidatos se utilizó Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) y sondas Taqman Gene Expression Assays probes (Applied Biosystems) (tabla 8):

Tabla 7. Sondas utilizadas para PCR cuantitativa a tiempo real.

TaqMan® Gene Expression Assay Probe	Probe ID
TBP	Hs00427620_m1
EIF2B2	Hs00204540_m1
Tet2	Hs00325999_m1
Edil3	Hs00964112_m1
SDC2	Hs01081432_m1
Spock1	Hs00270274_m1

La qPCR se realizaron por triplicado en el sistema StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente protocolo: 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

La expresión se calculó con el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta CT}$, utilizando los genes TBP y EIF2B2 como controles endógenos. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de *Student* de muestras pareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativo cuando $p < 0.005$.

Ensayo ELISA para EDIL3

Las células MDA-MB-468, MDA-MB-468R y MDA-MB-231 se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta un 90% y se incubaron con 3 mL de RPMI suplementado libre de suero fetal bovino y de rojo fenol. Tras de tratamiento de las células con 0.1%v/v DMSO o 10 μ M de cilengitide durante 72 h se tomó de medio de cultivo de cada una de las condiciones para cuantificar el EDIL3 secretado. Se utilizó un ensayo de ELISA para EDIL3 (ELISA Kit for EGF Like Repeats And Discoidin I Like Domains Protein 3 (EDIL3), Cloud-Clone Corp) (art CUSAbio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada ensayo de ELISA se utilizaron tres réplicas. La absorbancia se midió a 450 nm y los valores obtenidos se analizaron con el programa informático Prism 4.0 software (GraphPad). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de *Student* de muestras pareadas y las diferencias se consideraron estadísticamente significativo cuando $p < 0.005$.

RESULTADOS

RESULTADO II. Bloqueo farmacológico de MCL1 como estrategia terapéutica en la sensibilización a paclitaxel

1.1. La administración de obatoclax revierte la resistencia a paclitaxel

Dado que MCL1 parece tener un papel importante en la generación de la resistencia a paclitaxel, el siguiente paso en nuestra investigación fue estudiar si la combinación de paclitaxel con fármacos que permiten inhibir esta proteína podía ser efectiva como terapia de sensibilización a paclitaxel. Utilizamos el modelo celular MDA-MB-231 ya que datos previos de nuestro laboratorio mostraban que esta línea celular resultaba ser resistente a paclitaxel y realizaba deslizamiento como mecanismo de supervivencia³⁸.

En primer lugar realizamos un ensayo de viabilidad para determinar la IC50 de obatoclax en la línea celular MDA-MB-231. Nuestros resultados mostraron que las células MDA-MB-231 presentaban una IC50 para obatoclax de $0.917 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (figura 36).

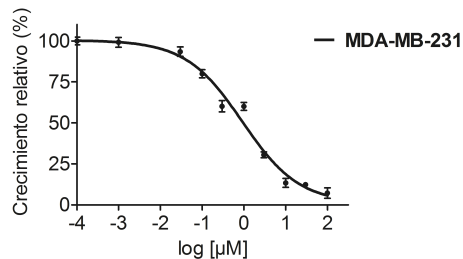


Figura 17. Curva dosis-respuesta para obatoclax en la línea MDA-MB-231. Los datos se muestran como la media \pm SEM.

Las células se trataron con $1 \mu\text{M}$ de obatoclax, $1 \mu\text{M}$ de paclitaxel o combinaciones de ambos fármacos y se utilizó DMSO como control. Las combinaciones utilizadas fueron: obatoclax seguido de paclitaxel; paclitaxel seguido de obatoclax; en las que se administró el segundo fármaco 8 h después de haber añadido el primero; y paclitaxel más obatoclax añadidos a la vez. Los experimentos se recogieron tras 48 h de tiempo final en todas las condiciones.

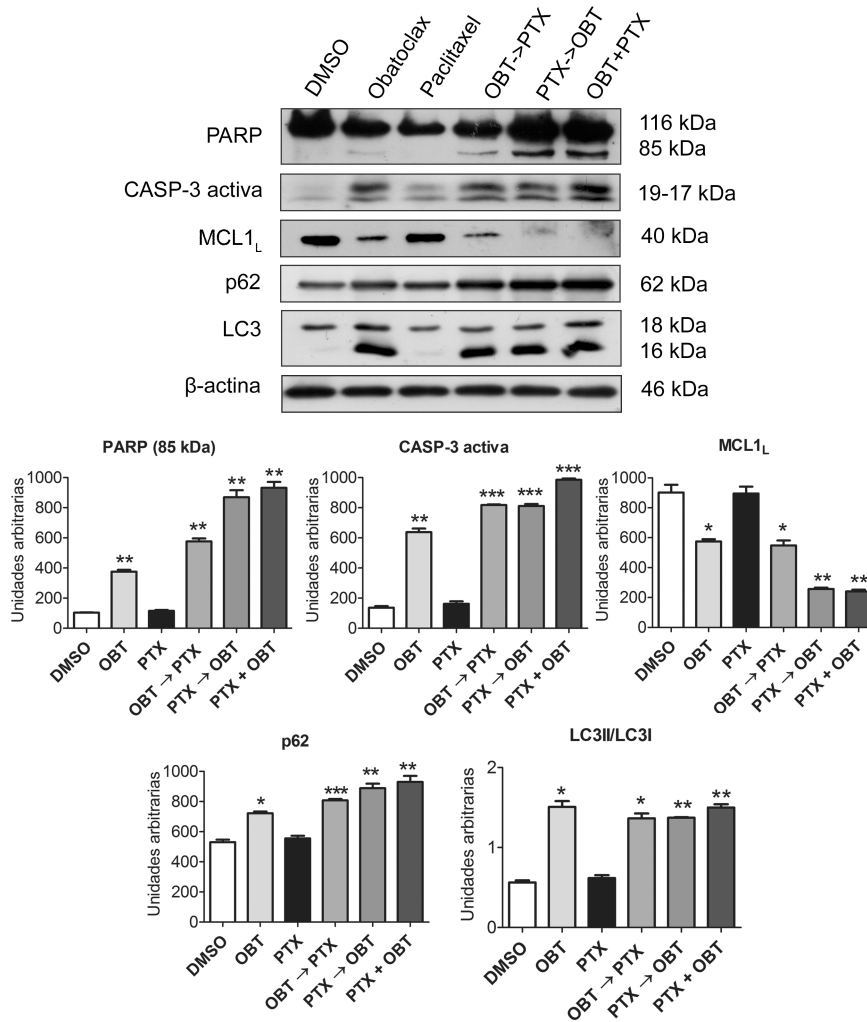


Figura 18. La adición de obatoclox revierte la resistencia a paclitaxel en la línea celular MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se trataron con 0.1% de DMSO, 1 μ M de obatoclox, 1 μ M de paclitaxel, 1 μ M de obatoclox durante 8 h seguido 1 μ M paclitaxel (OBT→PTX), 1 μ M de paclitaxel durante 8 h seguido de 1 μ M obatoclox (PTX→OBT) y 1 μ M paclitaxel más 1 μ M obatoclox añadidos a la vez (OBT + PTX), durante 48 h como tiempo final en todas las condiciones. Las proteínas PARP caspasa-3 activa (CASP-3 activa), MCL1, p62 y LC-3 se detectaron mediante *Western blot*. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra como histogramas el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. LC3 se calcula como la relación entre LC3II (16 kDa) y LC3I (18 kDa). Los datos de los experimentos triplicados se muestran como media \pm SEM de cada una de las condiciones comparada con el tratamiento con DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ del test *t* de Student.

El análisis de las proteínas mediante *Western blot* demostró diferencias dependientes del orden de administración de los fármacos. Observamos mayor ruptura de PARP y activación caspasa-3 en las condiciones: paclitaxel seguido de obatoclox y paclitaxel más obatoclox administrados a la vez. Tanto la banda de 85 kDa de PARP como la caspasa-3 activa aparecían

también, aunque con menor intensidad, cuando se administraba obatoclax solo o en la combinación obatoclax seguido de paclitaxel. Los niveles de la proteína MCL1 no disminuían con el tratamiento de paclitaxel, lo que podría explicar la resistencia a paclitaxel en esta línea celular, mientras que sí lo hacía en el resto de condiciones. Observamos que el mayor descenso se obtenía, de nuevo, en las combinaciones de paclitaxel seguido de obatoclax y paclitaxel más obatoclax administrados a la vez (figura 37).

Dado que se desconoce el mecanismo de acción de obatoclax y que en esta línea celular tanto la banda de 85 kDa de PARP como la caspasa-3 activa aparecen tras el tratamiento de este agente en monoterapia, se analizó también la presencia de marcadores de autofagia como LC3-B fragmentado o p62. Observamos que la banda de 16 kDa de la proteína LC3-B aparecía en todas las condiciones en las que se administraba obatoclax, y que además, la proteína p62 presentaba los mayores niveles de expresión tanto en la combinación paclitaxel seguido de obatoclax como en la condición en la que ambos fármacos se administran a la vez (figura 37).

Estos resultados parecen poner de manifiesto que obatoclax podría estar bloqueando la autofagia en la línea celular MDA-MB-231.

1.2. Análisis de ciclo celular

Con objeto de profundizar en el mecanismo mediante el cual obatoclax revierte la resistencia a paclitaxel en la línea celular MDA-MB-231, analizamos el comportamiento del ciclo celular. Las células se sometieron a los mismos tratamientos que analizamos previamente mediante *Western blot* y el comportamiento del ciclo celular se analizó a las 24 y a las 48 h de tiempo final de cada condición.

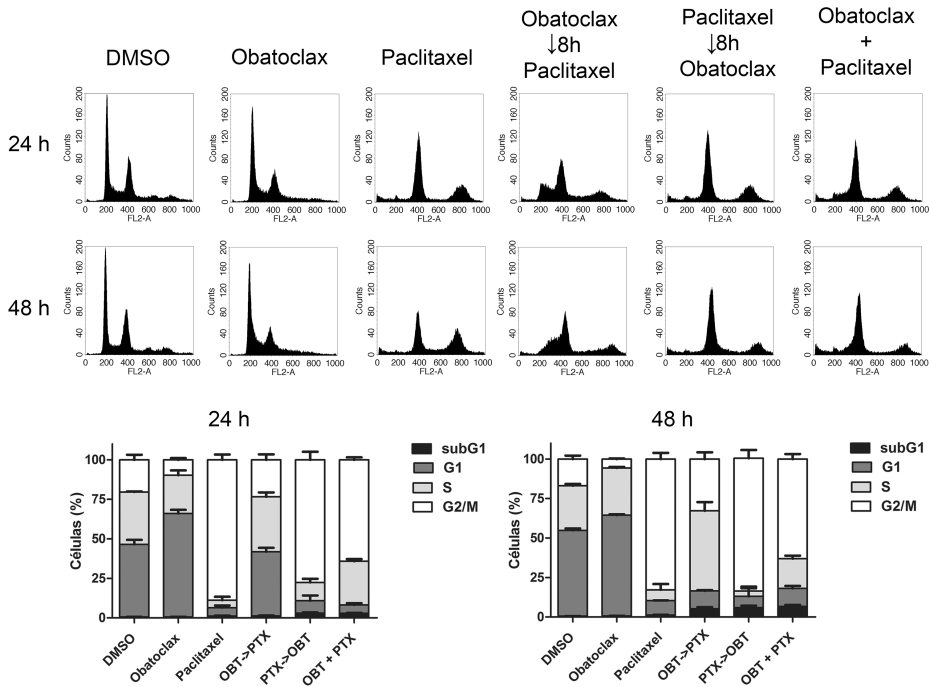


Figura 19. Análisis de ciclo celular de la línea MDA-MB-231. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo de las células MDA-MB-231 tratadas con DMSO, 1 μ M de paclitaxel, 1 μ M de obatoclox, 1 μ M de obatoclox durante 8 h seguido de 1 μ M paclitaxel (OBT->PTX), 1 μ M de paclitaxel durante 8 h seguido de 1 μ M de obatoclox (PTX->OBT) y 1 μ M paclitaxel más 1 μ M de obatoclox añadidos a la vez (OBT+PTX), durante 24 h y 48 h como tiempo final en todas las condiciones. Las células se marcaron con yoduro de propidio. La cuantificación de cada fase y de la fracción celular sub-G1 se muestran en histograma como media \pm SEM

Como muestra la figura 38, en la línea celular MDA-MB-231 el tratamiento con obatoclox mantuvo el ciclo celular en G1/S mientras que el tratamiento con paclitaxel provocó una parada en G2/M. Se observaron resultados similares a 24 como a 48 h. Sin embargo, las combinaciones de ambos fármacos tuvieron efectos diferentes dependientes de orden de tratamiento. Así, la combinación obatoclox seguido de paclitaxel provocó una parada en fase G1/S a las 24 h mientras que a las 48 h se producía un incremento del porcentaje de células en fase S. En la administración de paclitaxel seguido de obatoclox y de ambos a la vez, se observó un comportamiento similar que muestra una parada en G2/M. La fracción apoptótica sub-G0/G1 también parecía incrementarse en todas las combinaciones de fármacos, especialmente tras 48 h de tratamiento.

1.3. Análisis de ploidía

Finalmente, el análisis de FISH (figura 39) mostró que la ploidía de la línea MDA-MB-231 permanecía sin cambios tras el tratamiento con obatoclax. El 78 ± 2 % de las células tratadas con paclitaxel aumentaban su ploidía, lo que indicaba de estas células realizaban deslizamiento como mecanismo de resistencia a paclitaxel. Sin embargo, en todas las combinaciones de obatoclax y paclitaxel se reflejaba una disminución del porcentaje de células con alta ploidía. De tal manera que se observó un aumento de ploidía en el 25 ± 2 %, 38 ± 1 % y 39 ± 2 % de las células tratadas con obatoclax seguido de paclitaxel, paclitaxel seguido de obatoclax y paclitaxel más obatoclax, respectivamente, lo que sugiere que obatoclax podría estar impidiendo el deslizamiento.

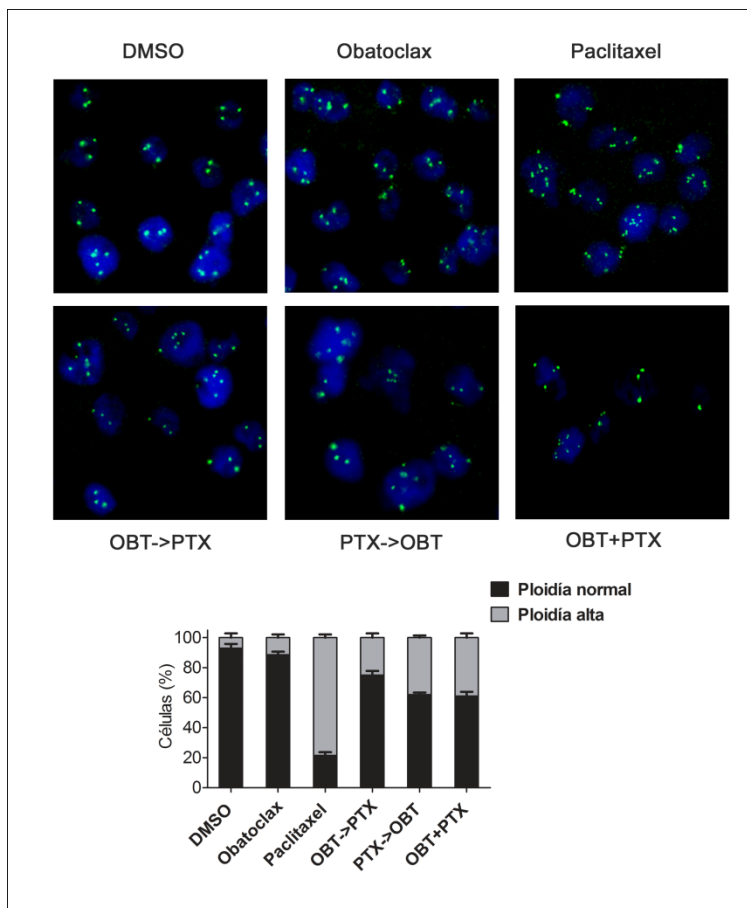


Figura 20. Análisis de la ploidía mediante FISH. El número de señales por célula se determinó con el cromosoma 17 (verde) en al menos 100 células por experimento. Las células se trataron con DMSO, 1 μ M de paclitaxel, 1 μ M de obatoclax, 1 μ M de obatoclax durante 8 h seguido de 1 μ M paclitaxel (OBT->PTX), 1 μ M de paclitaxel durante 8 h seguido de 1 μ M obatoclax (PTX->OBT) y 1 μ M paclitaxel más 1 μ M obatoclax añadidos a la vez (OBT+PTX), durante 48 h como tiempo final en todas las condiciones. Se muestran imágenes representativas de cada condición. Los histogramas

representan la media \pm SEM del porcentaje de células con ploidía normal o alta en cada condición, tomando como control la ploidía de la línea MDA-MB-231 tratada con DMSO.

Todos estos resultados sugieren que la administración de obatoclax podría impedir el deslizamiento en las células MDA-MB-231, lo que provoca una parada en mitosis más eficiente en las combinaciones paclitaxel seguido de obatoclax y ambos a la vez. Este evento junto con la disminución de MCL1 aumenta la muerte celular por bloqueo de la autofagia causando sensibilización al tratamiento con paclitaxel, especialmente en las condiciones mencionadas.

RESULTADO III. Influencia de EDIL3 en la EMT y en la resistencia a paclitaxel

2.1. Análisis de expresión diferencial con *microarray* de *Affymetrix*

Con objeto de profundizar en la caracterización de células sensibles y resistentes a paclitaxel analizamos el perfil de expresión génica de las líneas tumorales de mama MDA-MB-468 y MDA-MB-468R. Tanto para determinar la expresión diferencial de genes entre ambas líneas celulares como para identificar las modificaciones génicas inducidas por paclitaxel, realizamos un *microarray* que comparó simultáneamente el perfil de expresión de las células MDA-MB-468 en ausencia y en presencia de paclitaxel y MDA-MB-468R en ausencia de paclitaxel.

Análisis I. MDA-MB-468R *versus* MDA-MB-468 (*Gene 1.0 ST array*)

En primer lugar, a partir de los resultados obtenidos mediante el chip *Gene 1.0 ST array* se comparó el perfil génico de las células MDA-MB-468R resistentes a paclitaxel frente a las células parentales MDA-MB-468, ambas tratadas con DMSO. Este análisis permitió la identificación de 745 genes con cambios de expresión significativos entre ambas líneas celulares (figura 40).

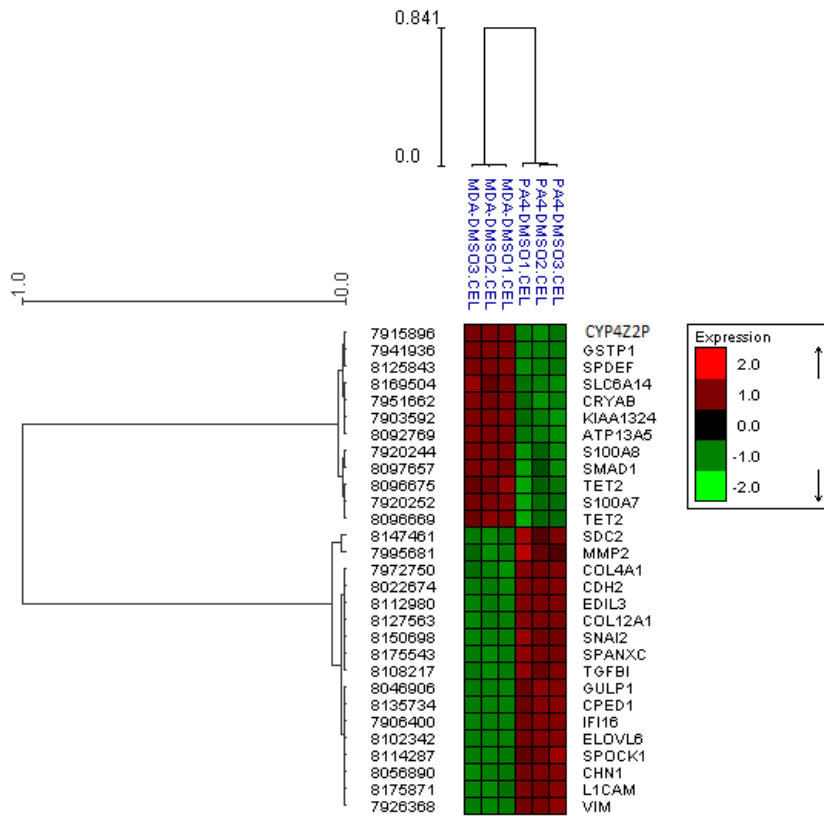


Figura 21. Representación en mapa de color (heat-map log2) basado en la expresión de los genes más representativos expresados en la línea MDA-MB-468R (PA4-DMSO) respecto a la línea MDA-MB-468 (MDA-DMSO). El mapa de color muestra los genes con un p-valor ≤ 0.05 cuya expresión está inducida (rojo) o reprimida (verde) en un valor ≥ 2 en la línea MDA-MB-468R con respecto a MDA-MB-468 obtenidos a partir de los datos de *Affymetrix*.

La tabla 9 muestra una selección de genes que se encuentran modificados en la línea resistente a paclitaxel MDA-MB-468R respecto a la línea parental. Hemos considerado estos genes de mayor interés ya que su implicación en procesos de migración, EMT y resistencia a fármacos se encuentra ampliamente descrita.

De los 405 genes con incremento de expresión, *EDIL3* muestra el mayor nivel de expresión en las células resistentes frente a las sensibles (FC=155). El segundo gen es *SNAI2*, también denominado *SLUG*, que reprime la expresión de *E-cadherina* en cáncer de mama.

Tabla 8. Resultados de las genes más relevantes obtenidos del análisis por *Affymetrix*.

GENE	FC	P value	Descripción
EDIL3	155.0	2.98e-08	EGF Like Repeats And Discoidin Domains 3
SNAI2	85.8	3.12e-05	Snail Family Transcriptional Repressor 2
SPANXC	59.8	8.34e-06	SPANX family member C
CDH2	41.7	1.71e-06	Cadherina 2, N-Cadherina
VIM	17.1	9.72e-06	Vimentina
SPOCK1	13.2	1.85e-04	SPARC/Osteonectin, Cwcv And Kazal Like Domains Proteoglycan 1
L1CAM	12.6	2.16e-05	L1 cell adhesion molecule
TGFB1	11.7	2.69e-05	Transforming Growth Factor Beta Induced
SDC2	3.5	5.86e-04	Syndecan 2
COL4A1	3.3	2.43e-05	Collagen type IV alpha 1 chain
MMP2	3.8	0.00228	Matrix metalloproteinase 2
ATP13A5	-26.6	3.59e-06	ATPase 13A5
CYP4Z1	-25.9	4.03e-05	Cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1
TET2	-2.4	6.93e-04	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
SMAD1	-2.3	5.65e-04	SMAD Family Member 1

Análisis II. MDA-MB-468 tratadas con paclitaxel *versus* MDA-MB-468 tratadas con DMSO (*Gene 1.0 ST array*)

En segundo lugar, se comparó los perfiles de expresión de las células parentales MDA-MB-468 en ausencia y en presencia de paclitaxel a partir de los resultados obtenidos mediante el chip *Gene 1.0 ST array*. En este experimento se identificaron 385 genes con cambios de expresión significativos, de los cuales 353 genes incrementaban su expresión cuando paclitaxel estaba presente en el medio de cultivo. Los dos genes con mayores incrementos de expresión en presencia de paclitaxel fueron *IL6* (interleucina-6) e *IL8* (interleucina-8). Asimismo, se identificaron otras interleucinas con expresión diferencial en estas células, entre ellas *IL18*, *IL1RL1*, *IL20RA*, *IL6R* e *IL7R*. Los genes que se identificaron con cambios de expresión significativa fueron en su mayoría genes involucrados en la respuesta a lípidos y la angiogénesis. Las vías de señalización TGF- β , TNF- α y receptor *Toll-like* y numerosas vías de integrinas se muestran alteradas en las células MDA-MB-468 expuestas a paclitaxel. Entre los genes que mostraron mayores descensos de expresión en células expuestas a paclitaxel se encontró *CYP4Z1* que codifica un miembro de la familia de enzimas del citocromo P450 que catalizan el metabolismo de fármacos.

Análisis III. Combinación análisis I y II

Los resultados obtenidos de los dos análisis anteriores, MDA-M-468R *versus* MDA-MB-468 y MDA-MB-468 tratada con paclitaxel *versus* MDA-MB-468 tratada con DMSO, se combinaron para determinar aquellos genes que mostraran cambios de expresión comunes en ambas comparaciones (figura 41). Así, en total se detectaron 1010 genes con cambio de expresión, de los que 120 resultaron ser comunes en ambos análisis (Anexo II. A). Entre estos genes no se encontraron *EDIL3*, *SNAI2*, *SPOCK1*, *SDC2* ni *TET2*. Estos datos sugieren que la diferencia de expresión de *EDIL3*, *SNAI2*, *SPOCK1*, *SDC2* y *TET2* observada solamente al comparar la línea resistente a paclitaxel MDA-MB-468R respecto a la parental podría estar relacionada con la adquisición de resistencia a paclitaxel, y no con las modificaciones génicas inducidas por el fármaco.

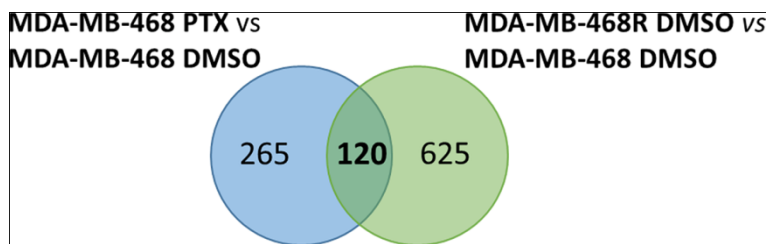


Figura 22. Diagrama de Venn que representa los genes con diferencias de expresión. Se muestra de manera gráfica el número de genes con diferencias de expresión en la comparación MDA-MB-468 tratada con paclitaxel *versus* MDA-MB-468 tratada con DMSO (círculo azul) y en la comparación comparar MDA-MB-468R tratada con DMSO *versus* MDA-MB-468 tratada con DMSO (círculo verde). El área común en ambos círculos representa el número de genes comunes con diferencias de expresión en las dos comparativas.

Análisis IV. Combinación con datos obtenidos de *Primeview*

Affymetrix array (COMBAT)

Además, en nuestro laboratorio disponíamos de resultados de *microarray s* con los que se había genotipado las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-468R en condiciones basales utilizando *Primeview Affymetrix array*. Debido a que sólo disponíamos de una réplica para cada tipo celular, los valores de intensidad no pudieron ser comparados estadísticamente. Con el objetivo de integrar esta información con las de las líneas celulares genotipadas con el chip *Genes 1.0 ST array*, recopilamos los datos de los niveles de genes tomando la media de los valores de intensidad de las sondas de cada gen.

Como resultado 17403 genes pudieron ser comparados. Las *Raw intensity values* de ambos experimentos se combinaron usando SVA (*Surogate Variable Analysis*) Bioconductor package y el algoritmo COMBAT²¹⁸. A pesar de que los resultados del análisis deben ser interpretados con

precaución, 836 genes mostraron cambios de expresión en las células MDA-MB-468R comparada con las células MDA-MB-468 en condiciones basales. *EDIL3* y *SNAI2* mostraron mayor incremento de expresión en la línea resistente a paclitaxel MDA-MB-468R, de manera similar a como sucedía en el experimento realizado con el chip *Gene 1.0 ST array* (figura 42).

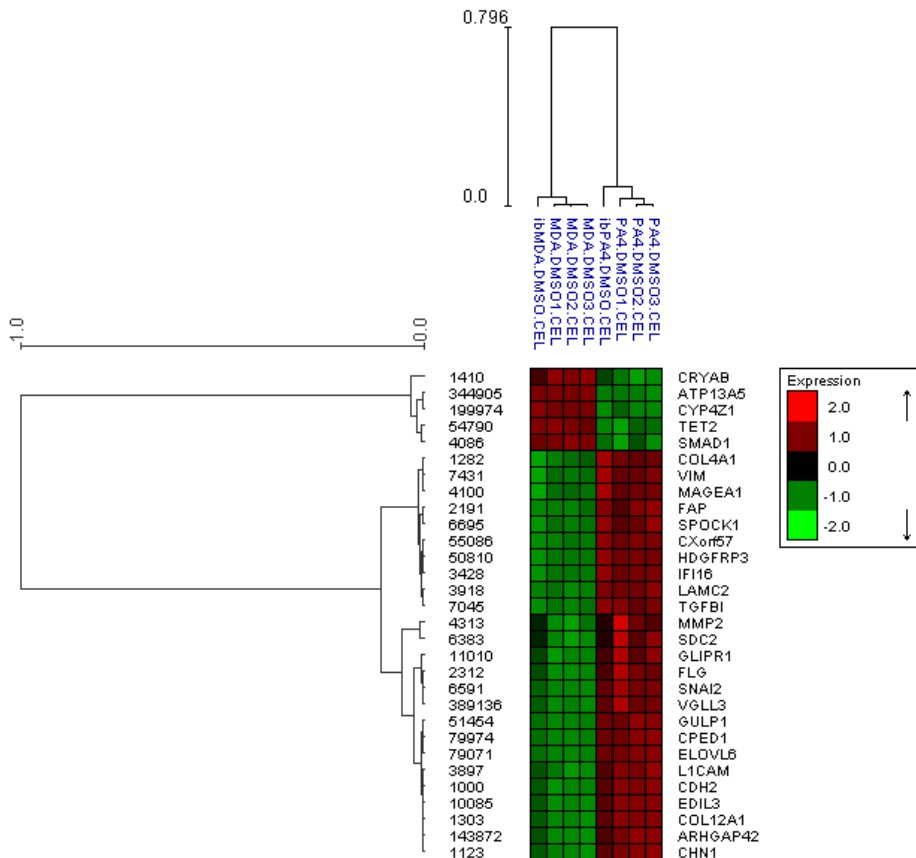


Figura 23. Representación en mapa de color (heat-map log₂) basado en la expresión de los genes más representativos expresados en la línea MDA-MB-468R respecto a la línea MDA-MB-468. El mapa de color muestra los genes con un p-valor ≤ 0.05 cuya expresión está inducida (rojo) o reprimida (verde) en un valor ≥ 2 en la línea MDA-MB-468R con respecto a MDA-MB-468 obtenidos a partir de del algoritmo COMBAT.

Tras comparar estos datos con los obtenidos en el análisis del *chip Gene 1.0 ST array*, 655 genes que mostraron cambios de expresión fueron comunes en ambas comparaciones (figura 43) entre los que se encontraban los genes *EDIL3*, *SDC2* y *SPOCK1* (Anexo II. B).

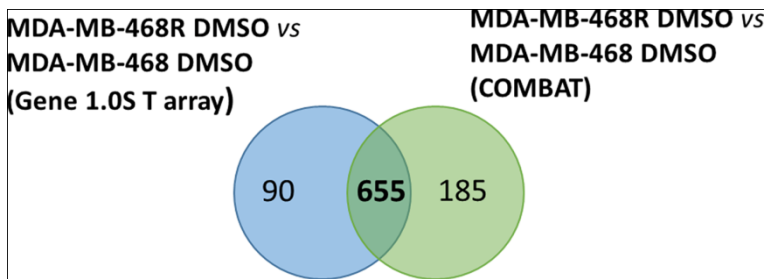


Figura 24. Diagrama de Venn que representa los genes con diferencias de expresión. Se muestra de manera gráfica el número de genes con diferencias de expresión en la comparación MDA-MB-468R tratada con DMSO *versus* MDA-MB-468 tratada con DMSO mediante *Gene 1.0 ST array* (círculo azul) y al comparar MDA-MB-468R tratada con DMSO *versus* MDA-MB-468 tratada con DMSO tras aplicar el algoritmo COMBAT (círculo verde). El área común en ambos círculos representa el número de genes comunes con diferencias de expresión en las dos comparativas.

2.2. Confirmación de *microarrays* mediante qPCR

Para confirmar la diferencia de expresión de algunos de los genes que se desprende de los resultados de los análisis de los *microarrays* comprobamos la expresión de *EDIL3*, *SDC2*, *SPOCK1* y *TET2* mediante qPCR. Para ello, utilizamos las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB468R e incluimos además la línea MDA-MB-231 ya que de acuerdo a nuestros resultados previos estas células mostraba la mayor resistencia a paclitaxel.

Para realizar la qPCR se emplearon triplicados de tres muestras independientes de cada línea celular, se utilizaron los genes *TBP* y *EIF2B2* como genes constitutivos y los resultados se analizaron aplicando la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los resultados que se desprenden de estos experimentos muestran sobreexpresión de los genes *EDIL3*, *SDC2* y *SPOCK1* en la línea resistente a paclitaxel MDA-MB-468R y la línea MDA-MB-231 con respecto a la línea parental MDA-MB-468, confirmando así los datos de los *microarrays*. Además se observan mayores niveles de *EDIL3* y *SDC2* en la línea MDA-MB-231 y valores similares de *SPOCK1* en las células MDA-MB-468R y MDA-MB-231. Por el contrario, *TET2* se encuentra sobreexpresado en la línea MDA-MB-468 mientras que los menores niveles se observan en las células MDA-MB-231 (figura 44).

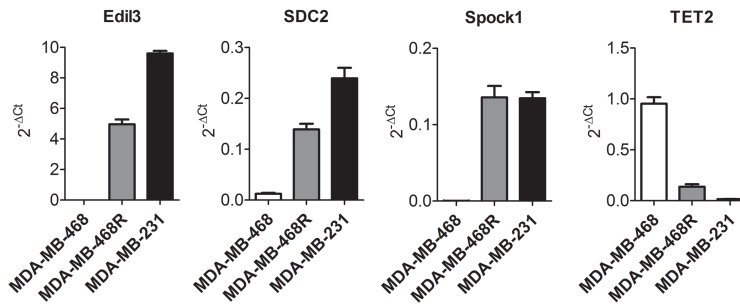


Figura 25. Análisis de expresión de los genes *EDIL3*, *SDC2*, *SPOCK1* y *TET2* mediante qPCR en las líneas MDA-MB-468, MDA-MB-468R Y MDA-MB-231. Se muestran como histogramas los resultados obtenidos de la aplicación de $2^{-\Delta Ct}$ para los valores de Ct de obtenidos mediante qPCR para *EDIL3*, *SDC2* (Sindecano-2), *SPOCK1* y *TET2*. Se utilizaron *TBP* y *EIF2B2* como genes constitutivos. Los datos de los experimentos triplicados se muestran como media \pm SEM.

3.3. Análisis de la expresión de EDIL3 y estudio del fenotipo epitelio-mesénquima de células de cáncer de mama

3.3.1. Expresión de EDIL3 en diversas líneas celulares de mama

Tanto los resultados del *microarray* como de los obtenidos mediante qPCR sugieren que EDIL3 podría estar directamente relacionado con la resistencia a paclitaxel y con el fenómeno de transición epitelio-mesénquima en cáncer de mama. Debido a que existen regulaciones no sólo a nivel transcripcional sino también a nivel de proteínas decidimos analizar mediante *Western blot* los niveles de la proteína de EDIL3 y ampliar además las líneas celulares analizadas. Utilizamos las líneas MDA-MB-468, MDA-MB-468R, SKBR3, BT474 Y MDA-MB-231 que de acuerdo con la literatura muestran diferencias respecto a su sensibilidad a paclitaxel y en cuanto a los niveles de expresión de componentes mesenquimales y epiteliales.

Nuestros resultados demostraron que a pesar de que las líneas presentaban diferentes niveles de expresión de EDIL3, las líneas MDA-MB-468R y MDA-MB-231 resultaron ser las únicas que mostraron incrementos estadísticamente significativos de la expresión de EDIL3 con respecto a las células MDA-MB-468 (figura 45).

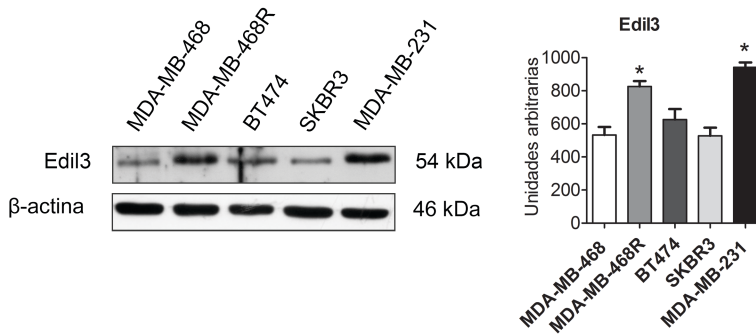


Figura 26. Expresión de EDIL3 en líneas de cáncer de mama. Análisis mediante *Western blot* de EDIL3, usando β -actina como control de carga, en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-468R, BT474, SKBR3 y MDA-MB-231 en condiciones basales. El análisis densitométrico de los datos de los experimentos triplicados se muestran en histogramas como media \pm SEM de cada una de las líneas celulares comparadas con MDA-MB-468. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ del test *t* de Student.

3.3.2. Análisis de expresión de marcadores mesenquimales y epiteliales

A continuación, analizamos mediante *Western blot* los niveles de expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y de marcadores mesenquimales como las proteínas vimentina y Slug en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-468R y MDA-MB-231.

El alto nivel de expresión de E-cadherina junto con la pérdida de expresión de vimentina y Slug indica un fenotipo epitelial en las células MDA-MB-468. En contraposición, la línea MDA-MB-231 muestra los menores niveles de E-cadherina y mayores niveles de vimentina y Slug, lo que indica que estas células presentan un fenotipo mesénquimal. Por su parte, las células MDA-MB-468R muestra un fenotipo intermedio entre ambas líneas. Estos datos sugieren la posible relación entre la EMT y la adquisición de resistencia a paclitaxel (figura 46).

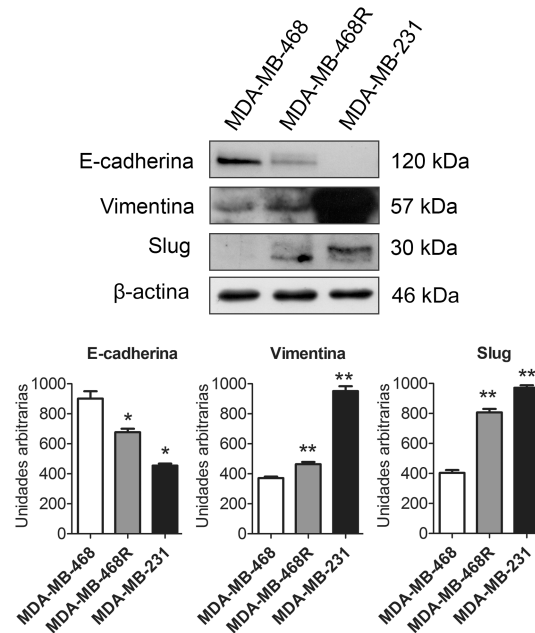


Figura 27. Expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en las células MDA-MB-468, MDA-MB-468R y MDA-M-231. Análisis mediante *Western blot* de las proteínas E-cadherina, Vimentina y Slug en las líneas celulares mencionada en condiciones basales. Se utilizó β-actina como control de carga. Se muestra como histogramas el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos de los experimentos triplicados se muestran como media ± SEM de cada línea celular con la línea parental MDA-MB-468. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 del test *t* de Student.

3.4. Silenciamiento de EDIL3 en la línea MDA-MB-231

Para adentrarnos en el conocimiento de la implicación de EDIL3 en la resistencia a paclitaxel y en el fenómeno EMT, decidimos investigar si la disminución de EDIL3 podría influir en ambos fenómenos. Dado que la línea celular MDA-MB-231 mostró los mayores niveles de expresión de EDIL3 y de marcadores mesenquimales y además resultaron ser las más resistentes a paclitaxel de las células analizadas, realizamos en ellas un silenciamiento transitorio con siRNA EDIL3 o siRNA control y a continuación se trataron con 1 μM de paclitaxel o 0.1% de DMSO durante 48 h.

En la figura 47 observamos que la apoptosis se inducía de manera más eficiente en las células MDA-MB-231 silenciadas con EDIL3 y tratadas con paclitaxel tal y como demostraba la mayor ruptura de PARP y caspasa-3. Además, los niveles de vimentina descendieron tras silenciamiento de EDIL3.

Estos datos parecen poner de manifiesto que la pérdida de EDIL3 provoca la sensibilización al tratamiento con paclitaxel y está relacionado con la pérdida de componentes mesenquimales en la línea celular MDA-MB-231. .

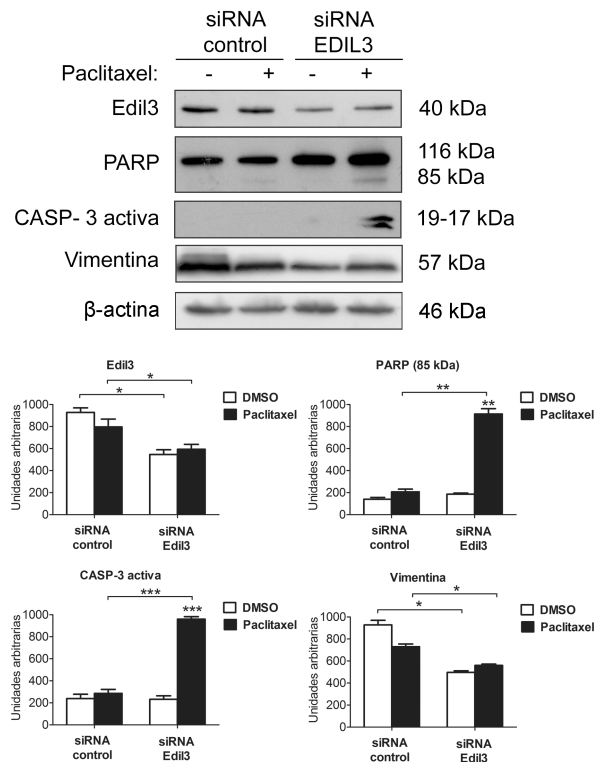


Figura 28. El silenciamiento de EDIL3 sensibiliza al tratamiento con paclitaxel y disminuye la expresión de marcadores mesenquimales en la línea celular MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se silenciaron con siRNA control o siRNA EDIL3 y se trataron con DMSO o 1 μ M de paclitaxel durante 48 h. Los niveles de expresión de EDIL3, PARP, caspasa-3 activa (CASP-3 activa) y vimentina se evaluaron mediante *Western blot*, utilizando β -actina como control de carga. El análisis densitométrico de las proteínas indicadas se muestran como histogramas. Los datos de los triplicados se muestran como la media \pm SEM de la comparación de siRNA control tratado con DMSO *versus* siRNA control tratado con paclitaxel, siRNA EDIL3 tratado con DMSO *versus* siRNA EDIL3 tratado con paclitaxel, siRNA tratado con DMSO *versus* siRNA EDIL3 tratado con DMSO y, siRNA control tratado con paclitaxel *versus* siRNA EDIL3 tratado con paclitaxel. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ del test *t* de Student.

3.5. Análisis de los niveles de EDIL3 secretado

EDIL3 posee un dominio RGD que permite la interacción con la integrina $\alpha v \beta 3$, por lo que nos planteamos si, como sucede con otros ligandos de esta integrina, EDIL3 podría tener un mecanismo de regulación autocrina.

Las células MDA-MB-468, MDA-MB-468R y MDA-M-231 se trataron con DMSO o cilengitide, un péptido sintético antagonista de la integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ que contiene la secuencia RGD. A continuación, analizamos la concentración de EDIL3 secretado al medio de cultivo mediante un ensayo ELISA. En la línea celular MDA-MB-468 tratada con DMSO se observó una concentración de EDIL3 de 1.469 ± 0.120 ng/mL que aumentó a un valor de

2.760 ± 0.227 ng/mL tras la administración de cilengitide. La línea celular MDA-MB-231 mostró una concentración de 15.733 ± 1.670 ng/mL de EDIL3 que, tras la administración de cilengitide, se incrementó hasta 20.737 ± 2.120 ng/mL. Las células MDA-MB-468R presentaron valores intermedio de EDIL3, desde 4.135 ± 0.637 ng/mL hasta 6.036 ± 0.938 ng/mL tras el tratamiento con cilengitide (figura 48).

Estos datos evidencian que la concentración de EDIL3 secretado al medio fue menor en la línea sensible a paclitaxel MDA-MB-468, mientras que los valores más elevados se observaron en la línea MDA-MB-231, de manera similar a como sucedía con los niveles de EDIL3 endógeno en los modelos celulares analizados. Además se observó que en las tres líneas celulares la concentración de EDIL3 en el medio de cultivo aumentó de manera estadísticamente significativa tras el tratamiento con cilengitide, lo que apunta a que EDIL3 podría presentar una regulación autocrina o paracrina de sus niveles a nivel celular.

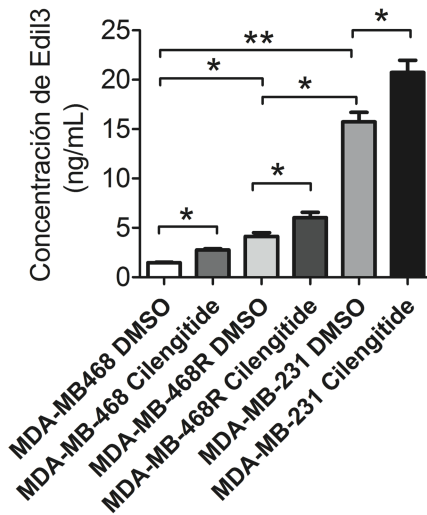


Figura 29. Análisis de la concentración de EDIL3 secretado al medio tras tratamiento con cilengitide. Análisis mediante ELISA para EDIL3 de la concentración de EDIL3 secretado tras el tratamiento con DMSO o $10 \mu\text{M}$ de cilengitide durante 72 h en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-468R y MDA-MB-231. Los datos de los experimentos triplicados se muestran en histogramas como media \pm SEM de la comparación MDA-MB-468 tratada con DMSO *versus* MDA-MB-468 tratada con cilengitide, MDA-M-468R tratada con DMSO *versus* MDA-MB-468R tratada con cilengitide, MDA-MB-231 tratada con DMSO *versus* MDA-MB-231 tratada con cilengitide, MDA-MB-468 tratada con DMSO *versus* MDA-MB-468R tratada con DMSO, MDA-MB-468 tratada con DMSO *versus* MDA-MB-231 tratada con DMSO, MDA-MB-468R tratada con DMSO *versus* MDA-MB-231 tratada con DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ del test *t* de Student.

3.6. Sensibilización de la línea MDA-MB-231 mediante tratamiento con cilengitide

Dado que la unión de EDIL3 a la integrina $\alpha v \beta 3$ parece ser importante para que EDIL3 ejerza su función a nivel celular, decidimos comprobar si el bloqueo de la unión de EDIL3 a la integrina podría restablecer la sensibilidad a paclitaxel en la línea MDA-MB-231.

Realizamos un ensayo de viabilidad para determinar la IC₅₀ de cilengitide en la línea MDA-MB-231. Nuestros resultados mostraron que las células MDA-MB-231 presentaban una IC₅₀ de 1.258 ± 0.04 para cilengitide (figura 49).

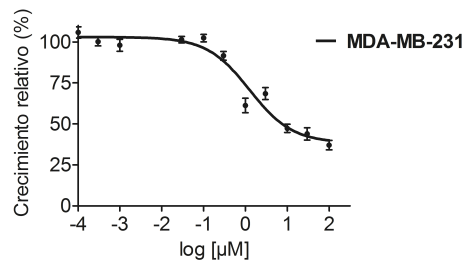


Figura 30. Curva dosis-respuesta de cilengitide en la línea MDA-MB-231. Los datos se representan como la media \pm SEM.

A continuación, las células se trataron con 0.1% de DMSO, 1 μ M de cilengitide, 1 μ M de paclitaxel o la combinación de 1 μ M cilengitide y 1 μ M paclitaxel durante 48 h. La figura 50 muestra que a pesar de que la administración de cilengitide provocara ruptura de PAPR y activación de caspasa-3, la mayor de inducción de muerte celular se produjo tras el tratamiento combinado de paclitaxel con cilengitide.

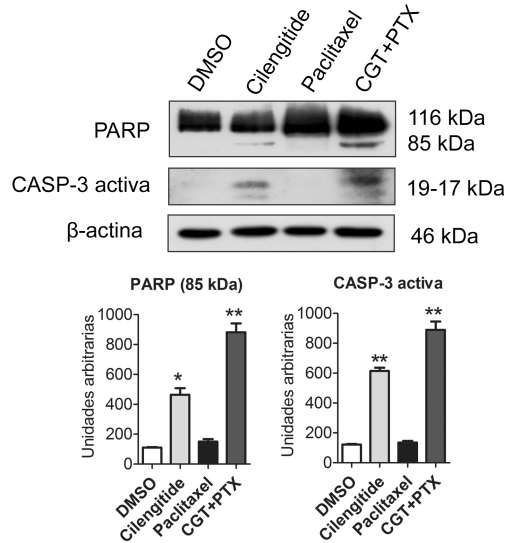


Figura 31. El tratamiento con cilengitide consigue la sensibilización a paclitaxel en la línea celular MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se trataron con 0.1% de DMSO, 1 μ M de cilengitide, 1 μ M de paclitaxel y la combinación de 1 μ M de cilengitide con 1 μ M paclitaxel durante 48 h. Las proteínas PARP y caspasa-3 activa (CASP-3 activa) se detectaron mediante *Western blot*. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra como histogramas el análisis densitométrico de las proteínas indicadas. Los datos de los experimentos triplicados se muestran como media \pm SEM de cada una de las condiciones comparada con DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ del test *t* de Student.

Estos resultados indican que la administración combinada de cilengitide y paclitaxel logra sensibilizar a paclitaxel a la línea celular MDA-MB-231.

DISCUSIÓN

RESULTADO II. Bloqueo farmacológico de MCL1 como estrategia terapéutica en la sensibilización a paclitaxel

Diversos estudios han mostrado una fuerte correlación entre los niveles de MCL1 y la ausencia de muerte por apoptosis como mecanismo de adquisición de resistencia a paclitaxel¹⁵⁵, por lo que esta proteína antiapoptótica se presenta como potencial diana terapéutica. En este sentido, obatoclax aparece como un buen complemento a los tratamientos antimetabólicos. Obatoclax pertenece a un grupo de moléculas miméticas BH3 que inhibe con gran afinidad a MCL1, lo que da lugar a la activación de proteínas pro-apoptóticas que provocan la liberación de citocromo c de la mitocondria y la entrada en apoptosis¹⁶¹. En la actualidad este fármaco se encuentra en ensayo clínico para pacientes con leucemia mieloide crónica. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito que este inhibidor provoca una parada en G1/S en células hematopoyéticas, el conocimiento sobre sus efectos en tumores sólidos es aún muy limitado.

Con objeto de profundizar en el estudio de obatoclax como posible agente sensibilizador a taxanos, utilizamos la línea MDA-MB-231 como modelo celular resistente al tratamiento con paclitaxel. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que tras 48 h de tratamiento con paclitaxel un alto porcentaje de las células MDA-MB-231 sufrían deslizamiento y presentaban una muerte celular apoptótica prácticamente imperceptible³⁸. A pesar de que en la literatura existen datos controvertidos²⁴³⁻²⁴⁵, algunos autores han demostrado que esta línea celular sufre deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel²³⁵. Otros investigadores han observado que las células MDA-MB-231 tratadas con paclitaxel mueren mediante un mecanismo no apoptótico tras sufrir un proceso de multinucleación²⁴⁴.

En nuestra investigación observamos que en las células MDA-MB-231 la adición de obatoclax provoca un aumento de apoptosis muy claro con respecto al tratamiento sólo con paclitaxel. Parece que las adaptaciones de esta línea celular para tolerar este taxano, la hacen más vulnerable a la presencia de otros inhibidores, resultado que parece interesante a la hora de emplear fármacos de segunda línea. Sin embargo, aún no hemos clarificado los mecanismos moleculares que actúan sobre el efecto observado.

Como hemos mencionado anteriormente paclitaxel ejerce su efecto estabilizando a los microtúbulos y provocando una parada en G2/M. Por su parte, obatoclax en administración única disminuye los niveles de proteínas antiapoptóticas, en especial a MCL1, y provoca una parada del ciclo celular en G1/S tanto a 24 como a 48 h en las células MDA-MB-231. Nos planteamos si la combinación de ambos fármacos permitiría favorecer que

paclitaxel provoque el estímulo pro-apoptótico que conduzca a la muerte celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares observados en la administración de ambos fármacos no son obvios. En nuestro estudio hemos observado que la inducción de muerte celular se incrementa en las combinaciones donde se administra paclitaxel seguido de obatoclax o bien, ambos a la vez. Por otra parte hemos comprobado que se produce también disminución del deslizamiento en las combinaciones de paclitaxel con obatoclax.

Se propone que en el caso en el que obatoclax se administre antes que paclitaxel, obatoclax es capaz de bloquear a MCL1 y provocar una parada de ciclo celular en G1/S. La célula bloqueada no consigue llegar a mitosis y no responde entonces a la adición de paclitaxel, que no puede ejercer su efecto en los microtúbulos. Por otro lado, el mecanismo que subyace cuando paclitaxel es administrado en primer lugar o al mismo tiempo que obatoclax no responde a este modelo. En este estudio, se propone que tras la parada en G2/M que provoca el tratamiento con paclitaxel, la línea celular MDA-MB-231 logra salir de mitosis mediante deslizamiento, en este momento el tratamiento con obatoclax conseguiría bloquear la salida de mitosis de las células e inhibir el deslizamiento como mecanismo de supervivencia a taxanos. En este sentido, se estaría produciendo una parada eficiente en G2/M, que junto con la disminución de de MCL1 conduciría a la muerte celular. Así pues, considerando todos los experimentos analizados de manera global, se puede concluir que la mayor inducción de muerte celular se consigue mediante el tratamiento con paclitaxel y obatoclax, donde la proteína MCL1 queda inhibida y se produce un arresto eficiente en G2/M.

En cuanto al posible mecanismo de muerte celular que induce obatoclax, existe mucha controversia. Se ha postulado que en líneas celulares de rhabdomyosarcoma, obatoclax induce muerte vía autofagia estimulando un evento clave como es la formación del necrosoma para conducir a necroptosis. Estos resultados se han demostrado recientemente en un estudio donde se observa que este fármaco es capaz de provocar la acumulación de vesículas de autofagosomas interaccionando con proteínas como Atg5, RIP1 o RIP3, sin que haya características bioquímicas de muerte por apoptosis como ruptura de PARP o activación de caspasas²⁴⁶. Sin embargo, en sus investigaciones Liang *et al* demostraron que la autofagia inducida por obatoclax puede ser citoprotectora dependiendo de la línea celular²⁴⁷.

Durante la formación de autofagosomas en mamíferos, se requieren dos modificaciones principales como son la conjugación de Atg-12 y la lipidación de LC3. Esta última forma lipidada de LC3, LC3-II, ha demostrado ser un marcador autofagosomal bastante consolidado, por lo que

se utiliza para estudiar la autofagia en tumorigénesis o en enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares²⁴⁸.

Nuestros resultados apuntan que en la línea celular MDA-MB-231 obatoclax en administración única es capaz de inducir autofagia, ya que el marcador principal LC3-B aparece fragmentado tanto en esta condición como en las tres combinaciones con paclitaxel. A pesar de que debemos seguir indagando en este mecanismo, podríamos estar ante un caso de muerte por necroptosis, apoptosis o ambas. En este caso para profundizar en el estudio de este modelo de muerte celular sería necesario analizar la expresión de otros marcadores de autofagia como proteínas de la familia ATG, beclina, marcadores de necroptosis, etc así como realizar estudios de citometría con Anexina V que permitan discernir si se trata de un tipo de muerte celular u otra.

Si bien es cierto que nuestra investigación no profundiza en este aspecto, resulta evidente que la combinación de ambos fármacos logra sensibilizar a las células resistentes al tratamiento con fármacos antimetabólicos. Este hallazgo podría ser vital en la búsqueda de nuevos fármacos de segunda línea que frenen la resistencia al tratamiento con taxanos en pacientes con cáncer de mama.

RESULTADO III. Influencia de EDIL3 en la EMT y en la resistencia a paclitaxel

El análisis de mecanismos de resistencia a taxanos y búsqueda de nuevos marcadores moleculares diagnósticos en cánceres tan prevalentes como el de mama, es sin duda una estrategia de gran importancia para el establecimiento de tratamientos más seguros y eficaces. Tanto la gran heterogeneidad de este tipo de neoplasias como el microambiente tumoral tan diverso fomentan la existencia de una gran diversidad de mecanismos de resistencia a taxanos.

El estudio de expresión génica diferencial dirigido a comparar los perfiles de expresión de la línea celular MDA-MB-468 y de la línea resistente a paclitaxel MDA-MB-468R, nos ha ayudado a dilucidar algunos mecanismos de adquisición de resistencia a taxanos, que sin duda serán de gran importancia para el diseño de alternativas terapéuticas. Asimismo, nos ha permitido obtener genes expresados diferencialmente que abren futuras líneas de investigación para la búsqueda de nuevos marcadores de progresión y predicción de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de mama.

Nuestros datos muestran que genes relacionados con el desarrollo, respuesta a sustancias externas, procesos de adhesión celular y de localización en la membrana y matriz extracelular se encuentran alterados en las células resistentes a paclitaxel. Como resultado de estos análisis una aproximación al problema de la resistencia tumoral que aparece tras tratamiento prolongado con agentes quimioterápicos podría ser la resistencia mediada por señales extracelulares e interacciones celulares. En este sentido hemos podido identificar genes con cambio de expresión significativa entre los que se encuentran algunos con funciones conocidas relacionados con la EMT. EMT es un proceso que otorga características mesenquimales a las células tumorales epiteliales como por ejemplo una disminución de la adhesión y un incremento de la motilidad. Se considera un paso crítico en las primeras fases de la metástasis tumoral. En la última década, un cúmulo de evidencias ha mostrado que las células de tumores epiteliales pueden experimentar un cambio drástico que las convierten en células mesenquimales migratorias. Algunos investigadores sostienen que a esta conversión se le puede atribuir a la salida de células de tumores epiteliales de su residencia primaria en la mama, para diseminarse hacia el hígado, los pulmones o la médula ósea. Dado que los tumores de mama presentan una alta capacidad para producir metástasis en ganglios linfáticos regionales y diseminarse a distancia, aunado a que diversos estudios clínicos sugieren que genes relacionados con EMT juegan un papel importante en la progresión del cáncer de mama²⁴⁹, las moléculas que interviene en este fenómeno pueden ser una diana novedosa y efectiva en el tratamiento de estos tumores.

Recientemente diversas evidencias han demostrado que existe un nexo cercano entre la EMT y la falta de sensibilidad a numerosos factores de crecimiento o agentes quimioterápicos. Sin embargo, es indispensable profundizar en la relación entre EMT y la resistencia a tratamientos. Así, cada vez se hace más necesario determinar si la EMT aumenta el desarrollo de la resistencia a fármacos mediante la alteración del crecimiento y/o la invasión potencial de las células o si las células resistentes muestran un determinado patrón de expresión génica. En este contexto, un cierto número de investigaciones han demostrado que el fenómeno de EMT está involucrado en la adquisición a resistencia a taxanos^{250,251}. Así pues, se ha publicado que la quimioresistencia a paclitaxel induce EMT, debido en parte a la sobreexpresión de la PI3K²⁵¹, y aumenta el potencial de metástasis en células de carcinoma de ovario²⁵⁰. Recientemente también se ha publicado que docetaxel induce quimioresistencia a través del aumento de la liberación de citoquinas e inducción del fenotipo de EMT mediante el aumento de la expresión de Snail y N-cadherina²⁵².

En nuestra investigación hemos estudiado la influencia de EDIL3 en el desarrollo de la resistencia a taxanos y en su implicación en la adquisición del fenómeno de EMT en el cáncer de mama. Hemos comprobado mediante dos estudios con *microarray* que *EDIL3* se encuentra sobreexpresado en la línea resistente a paclitaxel MDA-MB-468R al ser comparadas con las células parentales MDA-MB-468.

EDIL3 es una glicoproteína de matriz extracelular que contiene tres dominios EGF, entre los que se encuentra un motivo RGD, y dos dominios discontinuos. Esta proteína se expresa en células endoteliales durante el desarrollo embrionario vascular y promueve la adhesión de las células endoteliales a través de la interacción con los receptores de las integrinas²⁰³. Recientemente se ha demostrado que EDIL3 se expresa en varios tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama^{211,212}. A pesar de que EDIL3 posee un papel importante en la angiogénesis y desarrollo vascular, su función también está relacionada con la promoción de la migración y el fenómeno EMT principalmente a través de la interacción de su dominio RGD con la integrina $\alpha\beta 3$ ²⁵³.

Asimismo, nuestros datos muestran que algunos genes relacionados con el fenómeno de adhesión celular como *SPOCK1*, *SDC2* se encuentran sobreexpresados en la línea resistente MDA-MB-468R cuando se comparaba con las células MDA-MB-468. La evidencia acumulada ha confirmado que la amplificación de *SPOCK1*, tanto del mRNA como de la proteína, están involucradas en el control de la regulación del ciclo celular, apoptosis, y metástasis en carcinomas de próstata, vesícula biliar, pulmón, páncreas, hepatocarcinomas y de tumores neuroendocrinos gástricos^{189,254-258}. Sin

embargo la función biológica de SPOCK1 no se ha explorado ampliamente en cáncer de mama. Asimismo, se ha demostrado que la inducción de SPOCK1 mediada por la señalización EMT confiere resistencia a lapatinib²⁵⁹. Se ha descrito que la variabilidad entre los niveles de las proteínas antiapoptóticas y pro-apoptóticas de la familia BCL-2 contribuyen al efecto anti-apoptótico de SPOCK1 para promover el crecimiento tumoral a través de la participación de la vía de señalización PI3/AKT en cáncer colorectal²⁶⁰. Estudios recientes en hepatocarcinomas han demostrado que aquellas células que sobreexpresan SPOCK1 poseen altos niveles de metaloproteasa 9, lo que favorece que sean más invasivas, y que su inoculo en ratones inmunodeprimidos favorezca el desarrollo de nódulos metastásicos¹⁸⁹.

Por su parte, SDC2 es gen que codifica una proteína transmembrana capaz de regular la señalización a través de TGF- β , ya que es capaz de controlar los niveles de receptores de TGF- β de la superficie celular. Esto añade un nuevo nivel de complejidad a la acción del TGF- β , que regula la proliferación celular, diferenciación, adhesión, desarrollo, reparación de tejidos, inmunosupresión y supresión de tumores. Sin embargo, su regulación y señalización aguas abajo aún no está consensuada¹⁹⁵. En líneas de cáncer pulmonar este sindecano participa junto con el sindecano 4 en la organización del citoesqueleto de actina^{261,262}. Recientemente se ha demostrado la capacidad del sindecano-2 de inducir muerte celular por apoptosis a través de su dominio intracelular mediante la señalización de JNK, en células de osteosarcoma²⁶³ y su participación en la transformación oncogénica vía activación de ras²⁶⁴. Cabe destacar su papel como un co-receptor para el EVGF²⁶⁵ en procesos de angiogénesis, y su participación directa en la transición epitelio-mesénquima al modificar las propiedades morfológica, adhesivas e invasivas en células epiteliales principalmente mediante la inhibición de la activación de metaloproteinasas de matriz. Así, los cambios en la expresión de sindecano-2 se encuentran asociados da a la disminución de la expresión de E-cadherina. Este evento podría indicar un valor pronóstico de sindecano-2 en la progresión de algunos carcinomas²⁶⁶.

En sentido contrario, hemos observado que la expresión de *TET2* se encuentra disminuida en las células resistentes a paclitaxel. Este gen pertenece a la familia de de proteínas TET (TET1, TET2 y TET3) que catalizan la cadena de reacciones por las que la 5-metil-citosina (5mC) se transforma en 5-hidroximetil-citosina (5hmC) en el proceso de desmetilación activa del ADN. Dado que el nivel de 5-hmC en cáncer se encuentra reducido significativamente o alterado en diferentes tipos de tumor, se piensa que 5-hmC podría jugar un papel en los procesos de desarrollo y tumorigénesis^{267,268}. Diferentes malignidades tienen un miembro de la

familia TET diferente que se asocia con una función de supresor tumoral²⁶⁸. Además, estudios recientes sugieren que hay una correlación significativa entre la progresión tumoral y metástasis, sugiriendo que las proteínas de la familia TET pueden servir como supresores tumorales en ciertos tipos de cancer²⁶⁹.

Asimismo, no hemos encontrado diferencias en la expresión de ninguno de estos genes en la comparación entre las células MDA-MB-468 en ausencia y presencia de paclitaxel. Estos datos parecen indicar que la sobreexpresión de *EDIL3*, *SPOCK1*, *SDC2* y la disminución de *TET2* en las células resistentes a paclitaxel MDA-MB-468R puede ser debido a la resistencia *per sé* y no a la inducción o represión de estos genes por el tratamiento con el fármaco.

En nuestra investigación hemos confirmado mediante qPCR los resultados obtenidos en los *microarrays*. Asimismo, hemos incluido el estudio de la expresión de *SDC2*, *SPOCK1* y *TET2* en la línea celular MDA-MB-231. Nuestros resultados muestran que esta línea celular presenta mayores niveles de *EDIL3*, *SDC2* y *SPOCK1* y los menores niveles de *TET2*. Por el contrario, la línea celular MDA-MB-468 muestra los mayores niveles de *TET2* y los menores niveles de los otros tres genes estudiados. Nos planteamos entonces si la disminución de *EDIL3* observada en las células sensibles a paclitaxel podría estar relacionada con el fenómeno de EMT o con alteraciones epigenéticas. Se ha propuesto un mecanismo epigenético responsable de la desregulación de *EDIL3* en hepatocarcinomas en el que se ha identificado miR-137 como un regulador negativo de *EDIL3*²⁵³. En nuestro laboratorio tenemos indicios que demuestran que tras la administración de 0.1 μ M de azacitida, un agente de desmetilación, se produce un aumento de la expresión génica de *EDIL3* en la línea celular MDA-MB-468 (datos no mostrados). A pesar de continuar con los esfuerzos que permitan abordar esta perspectiva, nuestros resultados han demostrado que la mayor expresión de *EDIL3* se relaciona con el incremento de expresión de marcadores mesenquimales y con la mayor resistencia a paclitaxel. Asimismo, el silenciamiento de *EDIL3* en la línea tumoral MDA-MB-231 consiguió revertir la resistencia a paclitaxel, como lo demuestra la mayor inducción de PARP y activación de caspasa-3, así como disminuir la expresión marcadores mesenquimales como vimentina.

Xia et al demostraron que la sobreexpresión de *EDIL3* induce la fosforilación de SCR, ERK y SMAD2, sugiriendo la activación de la señalización de ERK y TGF- β . Estas importantes observaciones indican la existencia de un sistema de regulación circular para la EMT. En este circuito, la proteína *EDIL3* interacciona con la integrina que son glucoproteínas integrales de la membrana plasmática que intervienen en la adhesión con las células de la matriz extracelular, en su migración, en la organización del

citoesqueleto y en la transducción de señales, induciendo así la activación de las cascadas TGF- β y RAS/ERK. Una vez activadas, las vías TGF- β y RAS/ERK desencadenan la sobreexpresión de marcadores mesenquimales e integrinas, mientras promueven la desregulación de los marcadores epiteliales. Estos eventos moleculares se asociaron con un descenso de muerte celular y adquisición de cambios moleculares y morfológicos característicos de la EMT en células cancerosas²⁵³.

Asimismo, en nuestro estudio hemos utilizado cilengitide, el primer fármaco aprobado por la FDA que bloquea la unión de los ligando a las integrinas $\alpha 3\beta v$. Hemos observado que tras la administración de cilengitide se produce un aumento del EDIL3 secretado al medio en las tres líneas celulares analizadas MDA-MB-468, MDA-MB-468R y MDA-MB-31. Este evento pone de manifiesto que EDIL3 podría secretarse al medio e interactuar con la integrina $\alpha 3\beta v$ para ejercer su función. En este sentido, varios estudios han sugerido que la regulación autocrina de EDIL3 podría contribuir a un microambiente receptivo para la separación de la células en hepatocarcinomas y promover así la resistencia a anoikis, apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o porque las interacciones célula matriz son insuficientes o inapropiadas²⁷⁰.

Varios estudios han demostrado que cilengitide inhibe el crecimiento de las células de gliomas mediante el desprendimiento celular y la inducción de apoptosis en los modelos *in vitro*²⁷¹. Este inhibidor también ha demostrado inhibir la metástasis ósea en células MDA-MB-231²⁷². Asimismo, la administración de cilengitide resultó en una reducción significativa de la densidad de vasos funcionales y retraso el crecimiento del tumor y las metástasis *in vivo*²⁷³. Se ha demostrado que en tratamiento combinado con radioterapia o quimioterapia²⁷⁴ ha aumentado la eficiencia terapéutica en líneas celulares de cáncer de pulmón²⁷⁵ y la terapia combinada con radioinmunoterapia²⁷⁶ incrementa la eficiencia y apoptosis en modelos animales con tumores de mama.

Partiendo de todos estos supuesto nos planteamos si en combinación con paclitaxel y cilengitide podría revertir la resistencia a paclitaxel en la línea celular MDA-MB-231. Nuestros datos demuestran que en la línea celular MDA-MB-231 si bien, cilengitide en administración única induce muerte apoptótica, ésta se incrementa cuando se administran paclitaxel combinado con cilengitide como se demuestra con la mayor ruptura de PAPR y activación de caspasa-3.

En resumen, los datos obtenidos en esta investigación apuntan que niveles elevados de EDIL3, tanto de su expresión endógena como de su secreción al medio extracelular, correlacionan con la adquisición de características

mesenquimales y resistencia a paclitaxel en líneas tumorales de mama. Asimismo, hemos observado que el bloqueo de la interacción de esta glicoproteína con la integrina $\alpha\beta_3$, mediante la administración con cilengitide, consigue revertir la resistencia a paclitaxel, por lo que la combinación de cilengitide y paclitaxel podría constituir una nueva estrategia terapéutica que permita revertir la resistencia a este taxano.

CONCLUSIONS/CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. The administration of obatoclax enables to restore the sensitivity to paclitaxel treatment by arresting in G1/S phase that allows inhibition of slippage as a survival mechanism in MDA-MB-231 cells. Combining obatoclax and paclitaxel appear as a new therapeutic strategy for the treatment of paclitaxel resistant breast cancer cells.
2. *EDIL3* and genes related with extracellular matrix, focal adhesion and integrin family are the most relevant altered genes in paclitaxel-resistant MDA-MB-468R breast cancer cells.
3. *EDIL3* plays an important role in regulating EMT and response to paclitaxel. The administration of cilengitide increased paclitaxel-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells.

CONCLUSIONES

1. La administración de obatoclax logra restablecer la sensibilidad al tratamiento con paclitaxel mediante la parada en fase G1/S que permite inhibir el deslizamiento como mecanismo de supervivencia en las células MDA-MB-231. La combinación de obatoclax y paclitaxel supone una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de células de cáncer de mama resistentes a paclitaxel.
2. *EDIL3* y genes relacionados con matriz extracelular, adhesión focal y familia de integrinas son los genes más relevantes alterados en las células de cáncer de mama MDA-MB-468R resistentes a paclitaxel.
3. *EDIL3* juega un papel importante en la regulación de EMT y la respuesta a paclitaxel. La administración de cilengitide incrementa la apoptosis inducida por paclitaxel en las células MDA-MB-231.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reis-Filho, J. S., Weigelt, B., Fumagalli, D. & Sotiriou, C. Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Sci. Transl. Med.* **2**, 47ps43 (2010).
2. Reis-Filho, J. S. & Pusztai, L. Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *Lancet* **378**, 1812–1823 (2011).
3. Parker, J. S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. Matysiak, M., Kapka-Skrzypczak, L., Jodłowska-Jędrych, B. & Kruszewski, M. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* **295**, 817–825 (2017).
7. Krajewski, S. *et al.* Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **6**, 29–40 (1999).
8. Botha, J. L., Bray, F., Sankila, R. & Parkin, D. M. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur. J. Cancer* **39**, 1718–1729 (2003).
9. Karim-Kos, H. E. *et al.* Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur. J. Cancer* **44**, 1345–1389 (2008).
10. GLOBOCAN 2012 v1.0, C. I. and M. W. I. C. B. N. 11. <http://globocan.iarc.fr>. Acceso el 28 de enero de 2017.
11. Velanovich, V. Axillary lymph node dissection for breast cancer: a decision analysis of T1 lesions. *Ann. Surg. Oncol.* **5**, 131–139 (1998).
12. Simpson, J. F. & Page, D. L. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am. J. Clin. Pathol.* **102**, S3-8 (1994).
13. Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S. & Paryan, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biol.* **37**, 14479–14499 (2016).
14. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
15. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869–10874 (2001).

16. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–23 (2003).
17. Trop, I. *et al.* Molecular classification of infiltrating breast cancer: toward personalized therapy. *Radiographics* **34**, 1178–95 (2014).
18. Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1938–1948 (2010).
19. Allred, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod. Pathol.* **23**, S52–S59 (2010).
20. Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 698–707 (2012).
21. Singletary, S. E. *et al.* Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3628–3636 (2002).
22. Society, A. C. Comprehensive Cancer Network. *Breast cancer Treat. Guidel. patients Version VI*, (2006).
23. Meattini, I. *et al.* Systemic therapies and cognitive impairment for breast cancer: an overview of the current literature. *Med. Oncol.* **34**, 74 (2017).
24. (GEICAM), G. E. de I. en C. de M. *Guía de Práctica Clínica para el diagnóstico y tratamiento de cáncer de mama metastásico.* (2015).
25. Novotny WF, B. M. V. C. C. M. T. D. G. J. H. L. F. L. S. D. M. M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2- overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **20**, 719–726 (2002).
26. Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H. & Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **31**, 443–481 (2011).
27. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**, 253–265 (2004).
28. Altmann, K.-H. & Gertsch, J. Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 327–357 (2007).
29. Singh, P., Rathinasamy, K., Mohan, R. & Panda, D. Microtubule assembly dynamics: An attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* **60**, 368–375 (2008).
30. Kingston, D. G. I. Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents(1). *J. Nat. Prod.* **72**, 507–515 (2009).
31. Wang, T. & Ph, D. Paclitaxel-Induced Cell Death Where the Cell Cycle and Apoptosis Come Together. (1993).

32. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 60–65 (2007).
33. Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379–393 (2007).
34. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* **14**, 111–122 (2008).
35. Brito, D. A. & Rieder, C. L. Mitotic checkpoint slippage in Humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* **16**, 1194–1200 (2006).
36. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* **122**, 2579–2585 (2009).
37. Shi, J., Orth, J. D. & Mitchison, T. Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res.* **68**, 3269–3276 (2008).
38. Flores, M. L. *et al.* Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 917–928 (2012).
39. Overmoyer, B. Options for the treatment of patients with taxane-refractory metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **8 Suppl 2**, S61-70 (2008).
40. Henderson, I. C. *et al.* Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 976–983 (2003).
41. Mamounas, E. P. *et al.* Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: Results from NSABP B-28. *J. Clin. Oncol.* **23**, 3686–3696 (2005).
42. Martin, M. *et al.* Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2302–2313 (2005).
43. Buzdar, A. *et al.* Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial. *Clin. Cancer Res.* **8**, 1073–1079 (2002).
44. Martin, M. *et al.* Randomized Phase 3 Trial of Fluorouracil, Epirubicin, and Cyclophosphamide Alone or Followed by Paclitaxel for Early Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 805–814 (2008).
45. Goldstein, L. J. *et al.* E2197: Phase III AT (doxorubicin/docetaxel) vs. AC (doxorubicin/cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive and high risk node negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 512 (2005).

46. Brain, E. G. C., Bachelot, T. & Serin, D. Life-threatening sepsis associated with adjuvant doxorubicin plus docetaxel for intermediate-risk breast Cancer. *JAMA* **293**, 2367–2371 (2005).
47. Gianni, L. *et al.* Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 8715–8721 (2005).
48. Seidman, A. D. *et al.* CALGB 9840: Phase III study of weekly (W) paclitaxel (P) via 1-hour(h) infusion *versus* standard (S) 3h infusion every third week in the treatment of metastatic breast cancer (MBC), with trastuzumab (T) for HER2 positive MBC and randomized for T in HER2 no. *J. Clin. Oncol.* **22**, 512 (2004).
49. Trudeau, M. *et al.* Selection of adjuvant chemotherapy for treatment of node-positive breast cancer. *Lancet Oncol.* **6**, 886–98 (2005).
50. Gardner, E. R. *et al.* Randomized crossover pharmacokinetic study of solvent-based paclitaxel and nab-paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4200–4205 (2008).
51. Sparreboom, A. *et al.* Cancer Therapy: Clinical Comparative Preclinical and Clinical Pharmacokinetics of a (ABI-007) and Paclitaxel Formulated in Cremophor (Taxol). *Clin Cancer Res* **11**, 4136–4143 (2005).
52. Wang, T. H., Wang, H. S. & Soong, Y. K. Paclitaxel-induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* **88**, 2619–2628 (2000).
53. Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D. & Papadimitriou, C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 890–903 (2012).
54. Castilla, C. *et al.* Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology* **147**, 4960–4967 (2006).
55. Chang, J. C. *et al.* Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Mech. Dis.* **362**, 369–369 (2003).
56. Iwao-Koizumi, K. *et al.* Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J. Clin. Oncol.* **23**, 422–431 (2005).
57. Raff, M. Cell suicide for beginners. *Nature* **396**, 119 (1998).
58. Weil, M. *et al.* Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* **133**, 1053–1059 (1996).
59. Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* **17**, 2481–2495 (2003).

60. Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. Vanden & Vandenabeele, P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* **11**, 1050–1062 (2009).
61. Pop, C. & Salvesen, G. S. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* **284**, 21777–21781 (2009).
62. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science (80-.)*. **281**, 1305–1308 (1998).
63. Mahmood, Z. & Shukla, Y. Death receptors: Targets for cancer therapy. *Exp. Cell Res.* **316**, 887–899 (2010).
64. Um, H. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget* **7**, 5193–5203 (2015).
65. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science (80-.)*. **281**, 1322–1326 (1998).
66. Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell* **37**, 299–310 (2010).
67. Oliver, F. J., Rubia, G. De, Ruiz-ruiz, M. C., Murcia, G. De & Me, J. Importance of Poly (ADP-ribose) Polymerase and Its Cleavage in Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 33533–33539 (1998).
68. Hong, S. J., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 259–264 (2004).
69. Lubischer, J. L. The Cell Cycle, Principles of Control. David O. Morgan. *Integr. Comp. Biol.* **47**, 794–795 (2007).
70. Bardin, A. J. & Amon, A. MEN and SIN: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 815–826 (2001).
71. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
72. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458–467 (2009).
73. Johansen, T. & Lamark, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279–296 (2011).
74. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
75. Kunjappu, M. J. & Hochstrasser, M. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 2–12 (2014).
76. Tai, H.-C. & Schuman, E. M. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 826–838 (2008).
77. Groll, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* **386**, 463–471 (1997).

78. Lander, G. C. *et al.* Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* **482**, 186–191 (2012).
79. Song, L. & Rape, M. Reverse the curse—the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 156–163 (2008).
80. Love, K. R., Catic, A., Schlieker, C. & Ploegh, H. L. Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. *Nat Chem Biol* **3**, 697–705 (2007).
81. Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I. & Rape, M. Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the Human Anaphase-Promoting Complex. *Cell* **133**, 653–665 (2008).
82. Teixeira, L. K. & Reed, S. I. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 387–414 (2013).
83. Qiao, X., Zhang, L., Gamper, A. M., Fujita, T. & Wan, Y. APC/C-Cdh1. *Cell Cycle* **9**, 3904–3912 (2010).
84. Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369–381 (2006).
85. Welcker, M. & Clurman, B. E. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 83–93 (2008).
86. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin–proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 679–689 (2008).
87. Jin, J. *et al.* Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* **18**, 2573–2580 (2004).
88. Skaar, J. R., D'Angiolella, V., Pagan, J. K. & Pagano, M. SnapShot: F Box Proteins II. *Cell* **137**, 1358.e1–1358.e2 (2009).
89. Frescas, D. & Pagano, M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 438–449 (2008).
90. Margottin-Goguet, F. *et al.* Prophase Destruction of Emil by the SCF β TrCP/Slimb Ubiquitin Ligase Activates the Anaphase Promoting Complex to Allow Progression beyond Prometaphase. *Dev. Cell* **4**, 813–826 (2003).
91. Mora-Santos, M. *et al.* Glycogen Synthase Kinase-3 beta (GSK3 beta) Negatively Regulates PTTG1/Human Securin Protein Stability, and GSK3 beta Inactivation Correlates with Securin Accumulation in Breast Tumors. *J. Biol. Chem.* **286**, 30047–30056 (2011).
92. Mora-Santos, M. *et al.* A single mutation in Securin induces chromosomal instability and enhances cell invasion. *Eur. J. Cancer* **49**, 500–510 (2013).
93. Spruck, C. H. *et al.* hCDC4 Gene Mutations in Endometrial Cancer hCDC4 Gene Mutations in Endometrial Cancer 1. *Cancer Res.* **62**,

- 4535–4539 (2002).
94. Grim, J. E. *et al.* Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *J. Cell Biol.* **181**, 913–920 (2008).
 95. Bai, C. *et al.* SKP1 Connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box. *Cell* **86**, 263–274 (1996).
 96. Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M. & Sicheri, F. Structural Basis for Phosphodependent Substrate Selection and Orientation by the SCFCdc4 Ubiquitin Ligase. *Cell* **112**, 243–256 (2003).
 97. Liu, N. *et al.* The Fbw7/human CDC4 tumor suppressor targets proliferative factor KLF5 for ubiquitination and degradation through multiple phosphodegron motifs. *J. Biol. Chem.* **285**, 18858–18867 (2010).
 98. Kimura, T., Gotoh, M., Nakamura, Y. & Arakawa, H. hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53. *Cancer Sci.* **94**, 431–436 (2003).
 99. Mao, J.-H. *et al.* Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* **432**, 775–779 (2004).
 100. Min, S.-H. *et al.* Negative Regulation of the Stability and Tumor Suppressor Function of Fbw7 by the Pin1 Prolyl Isomerase. *Mol. Cell* **46**, 771–783 (2012).
 101. Girardini, J. E. *et al.* A Pin1/Mutant p53 Axis Promotes Aggressiveness in Breast Cancer. *Cancer Cell* **20**, 79–91 (2011).
 102. Pashkova, N. *et al.* WD40 Repeat Propellers Define a Ubiquitin-Binding Domain that Regulates Turnover of F Box Proteins. *Mol. Cell* **40**, 433–443 (2010).
 103. Balamurugan, K. *et al.* The tumour suppressor C/EBP δ inhibits FBXW7 expression and promotes mammary tumour metastasis. *EMBO J.* **29**, 4106–4117 (2010).
 104. Welcker, M., Larimore, E. a, Frappier, L. & Clurman, B. E. Nucleolar Targeting of the Fbw7 Ubiquitin Ligase by a Pseudosubstrate and Glycogen Synthase Kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1214–1224 (2011).
 105. Welcker, M. & Clurman, B. E. The SV40 Large T Antigen Contains a Decoy Phosphodegron That Mediates Its Interactions with Fbw7/hCdc4. *J. Biol. Chem.* **280**, 7654–7658 (2005).
 106. Wang, Q. *et al.* Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen. *Oncogene* **30**, 3875–3886 (2011).
 107. Lerner, M. *et al.* MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression. *Cell Cycle* **10**, 2172–2183 (2011).

108. Mavrakis, K. J. *et al.* A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat. Genet.* **43**, 673–678 (2011).
109. Kurashige, J. *et al.* Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **106**, 182–188 (2012).
110. Xu, Y., Sengupta, T., Kukreja, L. & Minella, A. C. MicroRNA-223 Regulates Cyclin E Activity by Modulating Expression of F-box and WD-40 Domain Protein 7. *J. Biol. Chem.* **285**, 34439–34446 (2010).
111. Akhoondi, S. *et al.* FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res.* **67**, 9006–9012 (2007).
112. Malyukova, A. *et al.* The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling. *Cancer Res.* **67**, 5611–6 (2007).
113. Strohmaier, H. *et al.* Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* **413**, 316–322 (2001).
114. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148–1159 (2008).
115. Jjingo, D., Conley, A. B., Yi, S. V, Lunyak, V. V & Jordan, I. K. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* **3**, 462–474 (2012).
116. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**, 245–254 (2003).
117. Akhoondi, S. *et al.* Inactivation of FBXW7/hCDC4- β expression by promoter hypermethylation is associated with favorable prognosis in primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R105 (2010).
118. Reed, S. E. *et al.* Mutation of hCDC4 Leads to Cell Cycle Dereglulation of Cyclin E in Cancer Advances in Brief Mutation of hCDC4 Leads to Cell Cycle Dereglulation of Cyclin E in Cancer. 795–800 (2004).
119. Ibusuki, M., Yamamoto, Y., Shinriki, S., Ando, Y. & Iwase, H. Reduced expression of ubiquitin ligase FBXW7 mRNA is associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Cancer Sci.* **102**, 439–45 (2011).
120. Cheng, Y. & Li, G. Role of the ubiquitin ligase Fbw7 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 75–87 (2012).
121. Zhang, W. & Koepp, D. M. Fbw7 Isoform Interaction Contributes to Cyclin E Proteolysis. *Mol. Cancer Res.* **4**, 935–943 (2006).
122. Welcker, M. & Clurman, B. E. Fbw7/hCDC4 dimerization regulates

- its substrate interactions. *Cell Div.* **2**, 7 (2007).
123. Ye, X. *et al.* Recognition of Phosphodegron Motifs in Human Cyclin E by the SCF Fbw7 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* **279**, 50110–50119 (2004).
 124. Minella, a C., Grim, J. E., Welcker, M. & Clurman, B. E. p53 and SCFFbw7 cooperatively restrain cyclin E-associated genome instability. *Oncogene* **26**, 6948–6953 (2007).
 125. Spruck, C. H., Won, K.-A. & Reed, S. I. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* **401**, 297–300 (1999).
 126. Scott, K. A. & Walker, R. A. Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br. J. Cancer* **76**, 1288–1292 (1997).
 127. Kim, H. K. *et al.* Cyclin E overexpression as an independent risk factor of visceral relapse in breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **27**, 464–471 (2001).
 128. Donnellan, R., Kleinschmidt, I. & Chetty, R. Cyclin E immunoexpression in breast ductal carcinoma: Pathologic correlations and prognostic implications. *Hum. Pathol.* **32**, 89–94 (2001).
 129. Dang, C. V. *et al.* The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 253–264 (2006).
 130. Meyer, N. & Penn, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 976–990 (2008).
 131. Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L. & Eisenman, R. N. An Overview of MYC and Its Interactome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a014357–a014357 (2014).
 132. Welcker, M. *et al.* The FBW7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *PNAS* **101**, 9085–9090 (2004).
 133. Fu, J., Bian, M., Jiang, Q. & Zhang, C. Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **5**, 1–10 (2007).
 134. Carmena, M. & Earnshaw, W. C. The cellular geography of Aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 842–854 (2003).
 135. Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G. & Maller, J. L. A Novel Mechanism for Activation of the Protein Kinase Aurora A. *Curr. Biol.* **13**, 691–697 (2003).
 136. Otto, T. *et al.* Stabilization of N-Myc Is a Critical Function of Aurora A in Human Neuroblastoma. *Cancer Cell* **15**, 67–78 (2009).
 137. Yao, J. *et al.* Aurora-A down-regulates I κ B α via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. *Mol. Cancer* **8**, 95 (2009).
 138. Li, D. H. *et al.* Overexpression of Oncogenic Stk15/Btak/Aurora-A

- Kinase in Human Pancreatic-Cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 991–997 (2003).
139. Sakakura, C. *et al.* Tumour-amplified kinase BTK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br. J. Cancer* **84**, 824–831 (2001).
 140. Xu, J. *et al.* Aurora-A identifies early recurrence and poor prognosis and promises a potential therapeutic target in triple negative breast cancer. *PLoS One* **8**, e56919 (2013).
 141. Zhang, D. *et al.* Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene* **23**, 8720–8730 (2004).
 142. Barr, F. A., Sillje, H. H. W. & Nigg, E. A. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 429–441 (2004).
 143. de Carcer, G. *et al.* Plk5, a Polo Box Domain-Only Protein with Specific Roles in Neuron Differentiation and Glioblastoma Suppression. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1225–1239 (2011).
 144. Elowe, S., Hümmer, S., Uldschmid, A., Li, X. & Nigg, E. A. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev.* **21**, 2205–19 (2007).
 145. Lindon, C. & Pines, J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* **164**, 233–241 (2004).
 146. Bassermann, F. *et al.* The Cdc14B-Cdh1-Plk1 Axis Controls the G2 DNA-Damage-Response Checkpoint. *Cell* **134**, 256–267 (2008).
 147. Giráldez, S. *et al.* SCF(FBXW7 α) modulates the intra-S-phase DNA-damage checkpoint by regulating Polo like kinase-1 stability. *Oncotarget* **5**, 4370–83 (2014).
 148. Lindon, C. & Pines, J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* **164**, 233–241 (2004).
 149. Ito, Y. *et al.* Caveolin-1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma of the thyroid. *Br. J. Cancer* **86**, 912–916 (2002).
 150. Knecht, R., Elez, R., Oechler, M. & Al., E. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* **59**, 2794–2797 (1999).
 151. Weichert, W. *et al.* Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch.* **446**, 442–450 (2005).
 152. Ramani, P., Nash, R., Sowa-Avugrah, E. & Rogers, C. High levels of polo-like kinase 1 and phosphorylated translationally controlled tumor

- protein indicate poor prognosis in neuroblastomas. *J. Neurooncol.* **125**, 103–111 (2015).
153. Zhang, R. *et al.* Misregulation of polo-like protein kinase 1, P53 and P21WAF1 in epithelial ovarian cancer suggests poor prognosis. *Oncol. Rep.* **33**, 1235–1242 (2015).
 154. Wertz, I. E. *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* **471**, 110–114 (2011).
 155. Castilla, C. *et al.* Prostate cancer cell response to paclitaxel is affected by abnormally expressed securin PTTG1. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2372–2383 (2014).
 156. Inuzuka, H. *et al.* SCF(Fbw7) regulates cellular apoptosis by targeting Mcl-1 for ubiquitination and destruction. *Nature* **471**, 104–109 (2011).
 157. Wertz, I. E. *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* **471**, 110–114 (2011).
 158. Gomez-Bougie, P. *et al.* Noxa Up-regulation and Mcl-1 Cleavage Are Associated to Apoptosis Induction by Bortezomib in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **67**, 5418–5424 (2007).
 159. Wuillème-Toumi, S. *et al.* Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* **19**, 1248–1252 (2005).
 160. Flores, M. L. *et al.* Loss of PKC ζ induces prostate cancer resistance to paclitaxel through activation of wnt/ β -catenin pathway and Mcl-1 accumulation. *Mol. Cancer Ther.* **15**, (2016).
 161. Konopleva, M. *et al.* Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (Obatoclax). *Cancer Res.* **68**, 3413–3420 (2008).
 162. Schimmer, A. D. *et al.* A Phase I Study of the Pan Bcl-2 Family Inhibitor Obatoclax Mesylate in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **14**, 8295–8301 (2008).
 163. Hwang, J. J. *et al.* Phase I Dose Finding Studies of Obatoclax (GX15-070), a Small Molecule Pan-BCL-2 Family Antagonist, in Patients with Advanced Solid Tumors or Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4038–4045 (2010).
 164. Li, J., Viallet, J. & Haura, E. B. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 525–534 (2008).
 165. Katzel, J. a, Fanucchi, M. P. & Li, Z. Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2**, 2 (2009).
 166. Jiang, C. C., Wroblewski, D., Yang, F., Hersey, P. & Zhang, X. D.

- Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress are more susceptible to apoptosis induced by the BH3 mimetic obatoclax. *Neoplasia* **11**, 945–55 (2009).
167. Mitchell, C. *et al.* Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 903–917 (2010).
168. Paik, P. K. *et al.* A phase II study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. *Lung Cancer* **74**, 481–485 (2011).
169. Christofori, G. New signals from the invasive front. *Nature* **441**, 444–450 (2006).
170. Kalluri, R. & Weinberg, R. a. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
171. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* **127**, 679–695 (2006).
172. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 131–142 (2006).
173. Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**, 3151–3161 (2005).
174. Scanlon, C. S., Van Tubergen, E. A., Inglehart, R. C. & D’Silva, N. J. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res.* **92**, 114–21 (2013).
175. De Craene, B. *et al.* The Transcription Factor Snail Induces Tumor Cell Invasion through Modulation of the Epithelial Cell Differentiation Program. *Cancer Res.* **65**, 6237 LP-6244 (2005).
176. Huber, M. A., Kraut, N. & Beug, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 548–558 (2005).
177. Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**, 1429–1437 (2009).
178. Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E. Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* **112**, 535–548 (2003).
179. Jeanes, A., Gottardi, C. J. & Yap, A. S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27**, 6920–6929 (2008).
180. Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365–375 (2004).
181. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat.*

- Rev. Cancer* **7**, 415–428 (2007).
182. Hatsell, S., Rowlands, T., Hiremath, M. & Cowin, P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **8**, 145–158 (2003).
 183. Nieto, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 155–166 (2002).
 184. Işeri, Ö. D. *et al.* Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed. Pharmacother.* **65**, 40–45 (2011).
 185. Kajita, M., Mcclinic, K. N. & Wade, P. a. Aberrant Expression of the Transcription Factors Snail and Slug Alters the Response to Genotoxic Stress Aberrant Expression of the Transcription Factors Snail and Slug Alters the Response to Genotoxic Stress. *Mol. cell Biol.* **24**, 7559–7566 (2004).
 186. Zavadil, J. & Böttinger, E. P. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764–5774 (2005).
 187. Bussemakers, M. J. & Schalken, J. A. The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. *World J. Urol.* **14**, 151–156 (1996).
 188. Yu, F. *et al.* SPOCK1 is upregulated in recurrent glioblastoma and contributes to metastasis and Temozolomide resistance. *Cell Prolif.* **49**, 195–206 (2016).
 189. Li, Y. *et al.* SPOCK1 Is Regulated by CHD1L and Blocks Apoptosis and Promotes HCC Cell Invasiveness and Metastasis in Mice. *Gastroenterology* **144**, 179–191.e4 (2013).
 190. Miao, L. *et al.* SPOCK1 is a novel transforming growth factor- β target gene that regulates lung cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 792–797 (2013).
 191. Bradshaw, A. D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 480–488 (2012).
 192. CAREY, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327**, 1–16 (1997).
 193. Afratis, N. A. *et al.* Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.* **284**, 27–41 (2017).
 194. Oh, E.-S. & Couchman, J. R. Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol. Cells* **17**, 181–7 (2004).
 195. Chen, L., Klass, C. & Woods, A. Syndecan-2 Regulates Transforming Growth Factor-b Signaling. *J Biol Chem* **279**, 15715–15718 (2004).
 196. Hynes, R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11–25 (1992).
 197. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* **275**, 21785–21788 (2000).

198. Lorger, M., Krueger, J. S., O'Neal, M., Staflin, K. & Felding-Habermann, B. Activation of tumor cell integrin $\alpha_3\beta_3$ controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10666–10671 (2009).
199. Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F. & Kessler, H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **10**, 753–768 (2010).
200. Nabors, L. B. *et al.* Phase I and Correlative Biology Study of Cilengitide in Patients With Recurrent Malignant Glioma. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1651–1657 (2007).
201. Reardon, D. A. *et al.* Randomized Phase II Study of Cilengitide, an Integrin-Targeting Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide, in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5610–5617 (2008).
202. Penta, K. *et al.* Dell Induces Integrin Signaling and Angiogenesis by Ligation of $\alpha_3\beta_3$. *J. Biol. Chem.* **274**, 11101–11109 (1999).
203. Hidai, C. *et al.* Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: An embryonic endothelial cell protein that binds the $\alpha_3\beta_3$ integrin receptor. *Genes Dev.* **12**, 21–33 (1998).
204. Hidai, C., Kawana, M., Kitano, H. & Kokubun, S. Discoidin domain of Dell protein contributes to its deposition in the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* **330**, 83–95 (2007).
205. Calvisi, D. F., Pascale, R. M. & Feo, F. Epidermal growth factor-like repeats and discoidin I-like domains 3: a multifaceted oncoprotein at the crossroad of MAPK and TGF-beta pathways in human hepatocellular carcinoma. *Transl. Cancer Res.* **5**, 103–109 (2016).
206. Zou, X. *et al.* Downregulation of developmentally regulated endothelial cell locus-1 inhibits the growth of colon cancer. *J. Biomed. Sci.* **16**, 33 (2009).
207. Lee, S.-H. *et al.* Del-1 overexpression potentiates lung cancer cell proliferation and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 92–98 (2015).
208. Beckham, C. J. *et al.* Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Dell1 and facilitate cancer progression. *J. Urol.* **192**, 583–592 (2014).
209. Damhofer, H. *et al.* Assessment of the stromal contribution to Sonic Hedgehog-dependent pancreatic adenocarcinoma. *Mol. Oncol.* **7**, 1031–1042 (2013).
210. Luo, J.-H. *et al.* Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* **44**, 1012–1024 (2006).
211. Moon, P.-G. *et al.* Identification of Developmental Endothelial Locus-

- 1 on Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Biomarker for Early Breast Cancer Detection. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1757–1766 (2016).
212. Lee, J. E. *et al.* Identification of EDIL3 on extracellular vesicles involved in breast cancer cell invasion. *J. Proteomics* **131**, 17–28 (2016).
213. Hidai, C., Kitano, H. & Kokubun, S. The Dell deposition domain can immobilize 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the extracellular matrix without interfering with enzymatic activity. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**, 569–573 (2009).
214. Aoki, M. *et al.* Expression of developmentally regulated endothelial cell locus 1 was induced by tumor-derived factors including VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 990–995 (2005).
215. Choi, E. Y. *et al.* Del-1 is an endogenous inhibitor of leukocyte-endothelial adhesion limiting inflammatory cell recruitment. **322**, 1101–1104 (2009).
216. Wang, Z., Kundu, R. K., Longaker, M. T., Quertermous, T. & Yang, G. P. The angiogenic factor Dell prevents apoptosis of endothelial cells through integrin binding. *Surgery* **151**, 296–305 (2012).
217. Penta, K. *et al.* Dell Induces Integrin Signaling and Angiogenesis by Ligation of V 3. *J. Biol. Chem.* **274**, 11101–11109 (1999).
218. Johnson, W. E., Li, C. & Rabinovic, A. Adjusting batch effects in *microarray* expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* **8**, 118–127 (2007).
219. Soto, C. *et al.* Capecitabine (X) and taxanes in patients (pts) with anthracycline-pretreated metastatic breast cancer (MBC): Sequential vs. combined therapy results from a MOSG randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol.* **24**, 570 (2006).
220. Martín, M. *et al.* Fluorouracil , Doxorubicin , and Cyclophosphamide (FAC) *Versus* FAC Followed by Weekly Paclitaxel As Adjuvant Therapy for High-Risk , Node-Negative Breast Cancer : Results From the GEICAM / 2003-02 Study. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2593–2599 (2013).
221. Martin, M. Docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide (the TAC regimen): an effective adjuvant treatment for operable breast cancer. *Women's Heal.* **2**, 527–537 (2006).
222. Hayes, D. F. *et al.* HER2 and Response to Paclitaxel in Node-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1496–1506 (2007).
223. McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. & McCann, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1785**, 96–132 (2008).
224. Hershko, D. D. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer* **112**, 1415–1424 (2008).

225. Shaye, A. *et al.* Cyclin E deregulation is an early event in the development of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **115**, 651–9 (2009).
226. Xu, J., Chen, Y. & Olopade, O. I. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* **1**, 629–640 (2010).
227. Singhi, A. D. *et al.* MYC Gene Amplification is Often Acquired in Lethal Distant Breast Cancer Metastases of Unamplified Primary Tumors. *Mod Pathol.* **25**, 378–387 (2012).
228. Ahonen, L. J. *et al.* Polo-like kinase 1 creates the tension-sensing 3F3/2 phosphoepitope and modulates the association of spindle-checkpoint proteins at kinetochores. *Curr. Biol.* **15**, 1078–89 (2005).
229. Michels, J. *et al.* MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **92**, 55–61 (2014).
230. Bannerji, R. *et al.* Apoptotic-Regulatory and Complement-Protecting Protein Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia: Relationship to In Vivo Rituximab Resistance. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1466–1471 (2003).
231. Hussain, S.-R. A. *et al.* Mcl-1 Is a Relevant Therapeutic Target in Acute and Chronic Lymphoid Malignancies: Down-Regulation Enhances Rituximab-Mediated Apoptosis and Complement-Dependent Cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2144–2150 (2007).
232. Harley, M. E., Allan, L. A., Sanderson, H. S. & Clarke, P. R. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1–cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J.* **29**, 2407–2420 (2010).
233. Spänkuch, B., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M. & Strebhardt, K. Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs. *Oncogene* **26**, 5793–807 (2007).
234. Finkin, S., Aylon, Y., Anzi, S., Oren, M. & Shaulian, E. Fbw7 regulates the activity of endoreduplication mediators and the p53 pathway to prevent drug-induced polyploidy. *Oncogene* **27**, 4411–4421 (2008).
235. Riffell, J. L., Zimmerman, C., Khong, A., McHardy, L. M. & Roberge, M. Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. *Cell Cycle* **8**, 3025–3038 (2009).
236. Topham, C. H. & Taylor, S. S. Mitosis and apoptosis: How is the balance set? *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 780–785 (2013).
237. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 321–330 (2006).
238. Shichiri, M., Yoshinaga, K., Hisatomi, H., Sugihara, K. & Hirata, Y. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes

- hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. *Cancer Res.* **62**, 13–17 (2002).
239. Kops, G. J. P. L., Weaver, B. A. A. & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773–785 (2005).
240. Takai, N., Hamanaka, R., Yoshimatsu, J. & Miyakawa, I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* **24**, 287–291 (2005).
241. Elowe, S., Hummer, S., Uldschmid, A., Li, X. & Nigg, E. A. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes & Dev.* **21**, 2205–2219 (2007).
242. van Vugt, M. A. T. M. *et al.* Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J Biol Chem* **279**, 36841–36854 (2004).
243. Arisan, E. D. *et al.* Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **119**, 271–281 (2010).
244. Blagosklonny, M. V., Robey, R., Sheikh, M. S. & Fojo, T. Paclitaxel-Induced FasL-Independent Apoptosis and Slow (Non-Apoptotic) Cell Death. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 113–117 (2002).
245. TABUCHI, Y. *et al.* Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **151**, 414–420 (1992).
246. Basit, F., Cristofanon, S. & Fulda, S. Obatoclox (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ.* **20**, 1161–1173 (2013).
247. Liang, L. Z. *et al.* Obatoclox induces Beclin 1- and ATG5-dependent apoptosis and autophagy in adenoid cystic carcinoma cells. *Oral Dis.* **21**, 470–477 (2015).
248. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2503–2518 (2004).
249. Feng, X. *et al.* Expression of EMT markers and mode of surgery are prognostic in phyllodes tumors of the breast. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.16497
250. Kajiyama, H. *et al.* Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **31**, 277–283 (2007).
251. DU, F. *et al.* Acquisition of paclitaxel resistance via PI3K-dependent

- epithelial-mesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* **30**, 1113–1118 (2013).
252. Zhang, C. C. *et al.* Synergistic Effect of the γ -Secretase Inhibitor PF-03084014 and Docetaxel in Breast Cancer Models. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 233–242 (2013).
253. Xia, H. *et al.* EDIL3 is a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition controlling early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **63**, 863–873 (2015).
254. Chen, Q. *et al.* SPOCK1 promotes tumor growth and metastasis in human prostate cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 2311–21 (2016).
255. Shu, Y. *et al.* SPOCK1 as a potential cancer prognostic marker promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the PI3K/AKT pathway. *Mol. Cancer* **14**, 12 (2015).
256. Wlazlinski, A. *et al.* Downregulation of several fibulin genes in prostate cancer. *Prostate* **67**, 1770–1780 (2007).
257. Prenzel, K. *et al.* Significant overexpression of SPARC/osteonectin mRNA in pancreatic cancer compared to cancer of the papilla of Vater. *Oncol. Rep.* **15**, 1397–1401 (2006).
258. Leja, J. *et al.* Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas. *Mod. Pathol.* **22**, 261–272 (2009).
259. Kim, H.-P. *et al.* Testican-1-mediated epithelial–mesenchymal transition signaling confers acquired resistance to lapatinib in HER2-positive gastric cancer. *Oncogene* **33**, 3334–3341 (2014).
260. Yang, J. *et al.* SPOCK1 promotes the proliferation, migration and invasion of glioma cells through PI3K/AKT and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Oncol. Rep.* **35**, 3566–76 (2016).
261. MUNESUE, S. *et al.* The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones. *Biochem. J.* **363**, 201 (2002).
262. Kusano, Y. Cooperation of Syndecan-2 and Syndecan-4 among Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans in the Actin Cytoskeletal Organization of Lewis Lung Carcinoma Cells. *J. Biochem.* **135**, 129–137 (2004).
263. Modrowski, D., Orosco, A., Thévenard, J., Fromigué, O. & Marie, P. J. Syndecan-2 overexpression induces osteosarcoma cell apoptosis: Implication of syndecan-2 cytoplasmic domain and JNK signaling. *Bone* **37**, 180–189 (2005).
264. Huang, J., Chen, C. & Chuang, N. P120-GAP associated with syndecan-2 to function as an active switch signal for Src upon transformation with oncogenic ras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 855–862 (2005).

265. ESSNER, J., CHEN, E. & EKKER, S. Syndecan-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 152–156 (2006).
266. Han, I., Park, H. & Oh, E.-S. New insights into syndecan-2 expression and tumourigenic activity in colon carcinoma cells. *J. Mol. Histol.* **35**, 319–326 (2004).
267. Lian, C. G. *et al.* Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma. *Cell* **150**, 1135–1146 (2012).
268. Kudo, Y. *et al.* Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.* **103**, 670–676 (2012).
269. Haffner, M. C. *et al.* Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* **2**, 627–637 (2011).
270. Feng, M.-X. *et al.* Elevated autocrine EDIL3 protects hepatocellular carcinoma from anoikis through RGD-mediated integrin activation. **13**, 1–17 (2014).
271. Oliveira-Ferrer, L. *et al.* Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **27**, 86 (2008).
272. Bretsch, M. *et al.* Cilengitide affects tumor compartment, vascularization and microenvironment in experimental bone metastases as shown by longitudinal 18F-FDG PET and gene expression analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 573–583 (2013).
273. Buerkle, M. A. *et al.* Inhibition of the alpha-v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br. J. Cancer* **86**, 788–795 (2002).
274. Tabatabai, G. *et al.* Targeting integrins in malignant glioma. *Target. Oncol.* **5**, 175–181 (2010).
275. Albert, J. M. *et al.* Integrin $\alpha\beta 3$ antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int. J. Radiat. Oncol.* **65**, 1536–1543 (2006).
276. Burke, P. A. *et al.* Cilengitide Targeting of $\alpha\text{v}\beta 3$ Integrin Receptor Synergizes with Radioimmunotherapy to Increase Efficacy and Apoptosis in Breast Cancer Xenografts. *Cancer Res.* **62**, 4263–4272 (2002).

ANEXOS

ANEXO I. RECETAS

Medio RPMI 1640

suplementado:

Medio RPMI 1640
10% suero fetal bovino
1 mM L-Glutamina 200mM
10mM Hepes 1M
50U/mL solución penicilina
5000U
50 µg/mL solución
Estreptomicina 5mg/mL

Medio de congelación:

Medio RPMI 1640
30% suero fetal bovino
1 mM L-Glutamina 200mM
10mM Hepes 1M
50U/mL solución penicilina
5000U
50 µg/mL solución
Estreptomicina 5mg/mL
10% DMSO

Tampón NP-40:

1% NonidetP-40 (NP-40)
10 mM Tris-Cl pH7.5
150 mM NaCl
10% glicerol

Tampón Laemmli 1X:

62.5 mM Tris-HCl pH 6.8
10% glicerol
2% SDS
5% β-mercaptoetanol

0.05% (p/v) azul de
bromofenol

Tampón Tris-Glicina (5X):

125 nM trizma base
1M glicina
0.5% SDS 10% pH 7.2

Tampón de transferencia :

25nM trizma base
192 nM glicina
20% metanol
Agua bidestilada c.s.p. 1L

Solución rojo Ponceau 1X:

0.2% Solución rojo Ponceau S
10X (Sigma)
10% ácido acético
Agua bidestilada c.s.p.

Tampón de bloqueo (10%):

10% Blocking Reagent
100 mL tampón maleico

Tampón bloqueo 1%:

1% Tampón bloqueo 10%
0.05% solución Tween 20
10%
0.045M Tampón Tris 0.05M

Tampón maleico:

100mM ácido maleico
150 mM NaCl
Ajustar pH 7.5

c.s.p. 2L

Tampón Tris 0.05M

0.042 M Trizma clorhídrico

0.008 M Trizma base

c.s.p. 20L

Tampón TBS-Tween 20

(10X):

1.5 M NaCl

200 mM Tris-HCl 1M pH 7.6

0.5% Tween 20

Ajustar pH 7.5 c.s.p. 1L

Tampón Tris-HCl 1M:

121.4g/L Trizma base

Ajustar pH 7.6 c.s.p. 1L

Solución SSC pH: 7.0 (20X):

3 M NaCl

0.3 M citrato trisódico

Ajustar pH: 7.0 c.s.p. 1L

Solución (2X)/NP-40

(0.3%):

300 mM NaCl

30 mM citrato trisódico

0.3% NP40

c.s.p. 100 mL

ANEXO II. GENES

A.

MDA-MB-468 paclitaxel vs MDA-MB-468 DMSO y MDA-MB-468R vs MDA-MB-468
ABCC2 ACTBL2 ADM AKR1C2 ALDH2 ALDH3B2 APCDD1 ARHGEF6 ATP13A5 ATP6V0A4 ATP6V1B1 CA2 CAB39L CALB2 CASP14 CHN1 CHST9 CLDN1 CLIP4 CLYBL COL12A1 CST6 CTNNAL1 CYP4B1 CYP4X1 CYP4Z1 CYR1 DAB2 DEPTOR DKK1 DUSP10 ELL2 ETS1 EVI2B FAM185A FAP FLRT3 FRMD6 FSCN1 GDAP1 GFPT2 GLIPR1 GPD1L HDAC9 HMOX1 IL20RA IL7R INA INHBA IRF1 ITGA5 JAG1 KIAA1324 KLRF1 KMO KRTAP2-4 L1CAM LAMB3 LAMC2 LEPREL1 LYNX1 MAB21L3 MAGI3 METTL7A MITF MSMB MUC1 MUCL1 NABP1 NCALD NDRG2 NEXN NNT NOV NPY1R NPY5R NUA1 OLR1 OTUD1 PALMD PBX1 PC PCDHB3 PDE8B PLCH1 POU2F3 PPFIBP2 PRODH PTRF RAB3B RASGRP3 RERG ROS1 S100A7A SCEL SCHIP1 SERPINE1 SERPINE2 SESN3 SLC46A3 SLURP1 SPDEF SPTSSB SRPX2 SRR ST8SIA1 STAC2 SULT1E1 SYBU SYT16 TCHHL1 TFPI2 TGFBI TMPRSS4 TRIL TRIM22 TSPAN5 VIM ZBTB7C ZNF462

B.

MDA-MB-468R DMSO vs MDA-MB-468 DMSO (Gene 1.0 ST array) y MDA-MB-468R DMSO vs MDA-MB-468 DMSO (COMBAT)
AARD ABAT ABCB1 ABCB2 ABHD3 ABLIM3 ACE2 ACPA ACSL4 ACSL5 ACS2 ACS3 ACTBL2 ACYP2 ADAMTS12 ADCY1 ADD2 ADM ADORA2B ADRA1B AGMO AGPAT4 AGR2 AIM2 AK3 AKR1C2 AKT3 ALDH2 ALDH3B2 ALS2CR8 AMIGO2 AMOT ANAPC16 ANKRD6 AP1M2 APCDD1 APOL2 AQP3 ARHGAP31 ARHGAP42 ARHGEF37 ARHGEF38 ARHGEF6 ARL15 ARNTL2 ARRB1 ATG4D ATP10D ATP13A5 ATP6VOA4 ATP6V1B1 AXL AZGP1 BARX2 BASP1 BCAT1 BCL11B BEX1 BICC1 BLNK BMP5 BOC BRWD1 BVES C10orf11 C10orf118 C10orf12 C11orf53 C11orf63 C12orf75 C19orf33 C19orf66 C1orf115 C1QTNF6 C21orf33 C21orf91 C3orf67 C4orf19 C6orf130 C6orf223 C9orf152 C9orf84 CAB39L CACNA2D1 CALB2 CAMK2D CAMK4 CASP1 CASP14 CASZ1 CATSPERB CAV1 CBLB CCDC80 CCL22 CCND1 CD14 CD68 CD82 CDH13 CDH2 CDR1 CFH CFI CHN1 CHODL CHRDL1 CHST15 CHST9 CITED4 CKB CLDN1 CLDN10 CLDN8 CLIC5 CLIP4 CLMP CLSTN2 CMYA5 CNKSR2 COG3 COL12A1 COL4A1 COL4A2 COTL1 CPAMD8 CPED1 CPPED1 CPQ CRABP1 CRABP2 CREB3L2 CRYAB CSGALNACT1 CST6 CTNNAL1 CTSL1 CTSL2 CXorf26 CXorf57 CYP27A1 CYP2R1 CYP39A1 CYP4B1 CYP4X1 CYP4Z1 CYP7B1 CYPR1 DAB2 DCBLD2 DCDC2 DDX58 DEPTOR DHRS7 DIO2 DIRAS2 DKK1 DNAH11 DNASE2 DNER DNMT3 DNMT1 DOCK4 DPYSL5 DSE DTX4 DUSP10 DYNLT3 E2F2 EDIL3 EDNRB EFEMP1 EHF EIF3G ELAVL2 ELF5 ELL2 ELOVL2 ELOVL6 ELOVL7 EML5 EMR2 ENPP1 ENPP4 EPDR1 EPHB1 EPS8 ESYT3 ETFDH ETS1 ETV1 EVI2B EXPH5 EXT1 EYA2 FADS2 FADS3 FAM126B FAM160A1 FAM171A1 FAM173B FAM178A FAM19A2 FAM49A FAM84A FAP FAR2 FBLN5 FBXL12 FDX1L FGF2 FLG FLRT3 FOXP1 FRMD5 FRMD6 FRY FSCN1 FSD1 FTL FUCA1 FUT8 FYB GAB2 GATM GBP1 GBP3 GCNT1 GDA GDAP1 GFPT2 GLB1L2 GLIPR1 GLRB GLRX GNAI1 GNAL GNAZ GNE GPD1L GPNMB GPR39 GPR63 GPRC5A GPRC5B GRHL3 GRIK2 GRK5 GSTM4 GSTP1 GUCY1A3 GUCY1B3 GULP1 HBE1 HDAC9 HDGFRP3 HDX HECW2 HERC3 HERC5 HIST3H2A HLA-F HMGA2 HMGNS HMOX1 HNMT HRASL2 HRCT1 HS6ST2 HSD17B11 HSD17B2 HSPA13 HTR1D ICOSLG IFI16 IFI35 IFI44 IFI6 IL12A IL20RA IL7R IMPA1 INA INHBA INPP4B INSR IQCK IRF1 ITGA3 ITGB4 JAG1 JAG2 JAZF1 JPH1 KAL1 KCNB1 KCNC4 KCNK1 KCNS3 KEAP1 KIAA0240 KIAA1324 KIAA1324L KIF16B KITLG KLRF1 KMO KRI1 KRT4 L1CAM LAMA3 LAMA4 LAMB3 LAMC1 LAMC2 LDOC1 LEPREL1 LGALS1 LHPP LIMA1 LINGO2 LMBRD2 LMO4 LONRF3 LOXL2 LRBA LRIG1 LRRC1 LURAP1L LY75 LYN LYNX1 LYPD1 LYPD5 MAB2L13 MAGEA1 MAGEC1 MAGED1 MAGI3 MAP7D2 MAPK13 MAPRE2 MARCH3 MBD5 MBNL3 MCAM MCM3AP MCTP1 MCTP2 MECOM MED12L MEF2C METTL15 METTL7A MICAL2 MKI67 MLF1 MMAA MMP13 MMP2 MPC1 MRPL4 MSMB MUC1 MUCL1 MUM1L1 MVP MYADM MYBL1 MYEF2 MYLK MYLK4 MYO1E MYO5A NABP1 NBEAL1 NCALD NDRG2 NEK3 NELL2 NEXN NFKBIZ NHLRC2 NLRP1 NME7 NMT2 NNMT NNT NOTCH3 NOV NPNT NPR3 NPY1R NPY5R NR2F1 NR2F2 NR3C2 NRIP3 NRK NRP1 NSUN7 NT5E NUAK1 NXF3 ODZ1 ODZ2 OLFM2 OLFM4 OLFML3 OLR1 OPHN1 OPN3 OSBP2 OTUB2 OTUD1 P4HA1 P4HA2 PADI3 PALMD PAM PAPP1 PARM1 PARP8 PAX7 PBX1 PC PDE8B PDE9A PDGF PDLM7 PDZ2 PDZK1IP1 PELI2 PFKP PGAP1 PHYH PI3 PIGO PIN1 PKIB PLA2G16 PLA2G4A PLA2R1 PLAT PLCB1 PLCH1 PLD1 PLEKHA5 PMP22 POU2F3 PPAP2A PPFIBP2 PPM1E PPP1R3C PPP2R2C PRAME PRKACA PRKCA PRKG1 PRODH PRR5L PRSS23 PRTFDC1 PTCHD1 PTH2R PTPRG PTPRM PTRF PTTG1IP PVRL3 PYGL RAB38 RAB39A RAB3B RAB3D RAI14 RASGRP3 RAVER1 RCAN2 RCBTB1 RERG RGP1 RHBDL2 RHOBTB3 RHOF RNF128 RNF152 RNF38 RORA ROS1 RPL7L1 RRAGD RRAS S100A4 S100A7 S100A7A S100A8 S100A9 SACS SAMD9 SAMD9L SAMHD1 SATB2 SCEL SDC2 SDCBP SELENBP1 SEMA3A SEMA3B SERPINA1 SERPINB5 SERPINB8 SERPINE1 SERPINE2 SESN3 SFMBT2 SGCD SGTB SHC3 SLC12A2 SLC15A1 SLC16A1 SLC16A10 SLC1A6 SLC24A3 SLC27A6 SLC28A3 SLC2A12 SLC2A13 SLC34A2 SLC35F1 SLC37A2 SLC39A10 SLC44A2 SLC46A3 SLC4A11 SLC6A14 SLC6A9 SLC7A8 SLC04C1 SLPI SLURP1 SMAD1 SMYD3 SNAI2 SNTB1 SOCS3 SP100 SPATA6 SPATS2L SPDEF SPG20 SPNS2 SPOCK1 SPRY1 SPTSSB SRPX SRPX2 SRR SSBP2 ST8SIA1 STAC2 STARD3NL STK10 STK39 STON2 SULT1E1 SVEP1 SYBU SYCP2 SYT1 SYT16 SYTL2 TAPBPL TBCK TC2N TCEA3 TCEAL8 TCHHL1 TCN1 TCP11L2 TESK1 TET2 TFCP2L1 TFP12 TGFB1 TGFB1 TGFB3 THBS1 THRB TIGD2 TLR1 TLR4 TLR6 TMC5 TMEM108 TMEM133 TMEM205 TMEM45B TMEM47 TMEM55A TMOD1 TMPRSS2 TMPRSS4 TNS3 TRIB2 TRIB3 TRIL TRIM22 TRMT10B TRPC1 TSC22D3 TSPAN5 TSPAN9 TTC28 TTC39A TUBB6 TYK2 UBE2E2 UBL5 UGCG UGT1A1 UHRF1BP1 UNC13B UNC5A UNC5B UST VGLL3 VIM VIPR1 WASF3 WBP5 WNT6 YBX2 ZBTB5 ZBTB7C ZC3H12C ZC4H2 ZCCH7 ZDHHC2 ZNF117 ZNF267 ZNF318 ZNF323 ZNF440 ZNF462 ZNF506 ZNF518A ZNF618 ZNF69 ZNF713 ZNF791 ZSWIM6 ZYX

ANEXO III. PUBLICACIONES

Gasca J, Flores ML, Giráldez S, Ruiz-Borrego M, Tortolero M, Romero F, Japón MA, Sáez C. Loss of FBXW7 and accumulation of MCL1 and PLK1 promote paclitaxel resistance in breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 16;7(33):52751-52765. doi: 10.18632/oncotarget.10481.

Flores ML, Castilla C, **Gasca J**, Medina R, Pérez-Valderrama B, Romero F, Japón MA, Sáez C. Loss of PKC δ Induces Prostate Cancer Resistance to Paclitaxel through Activation of Wnt/ β -Catenin Pathway and Mcl-1 Accumulation. *Mol Cancer Ther*. 2016 Jul;15(7):1713-25. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0951. Epub 2016 Apr 13.