

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

***MECANISMO DE ACCIÓN DE EDELFOFINA EN SARCOMA
DE EWING Y CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO***

Ximena Marcela Bonilla Forero

**Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de
Salamanca**

Universidad de Salamanca-CSIC

Salamanca, 2014

Dr. **Faustino Mollinedo García**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de la Universidad de Salamanca, y la Dra. María Ángeles Serrano García en calidad de tutora, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que la memoria "**Mecanismo de acción de Edelfosina en Sarcoma de Ewing y Cáncer de Cabeza y Cuello**" presentado por **Ximena Marcela Bonilla Forero**, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Mollinedo en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 17 de Enero de 2014.

Firmado: Dr. Faustino Mollinedo García

Director de la Tesis

Firmado: Dra. María Ángeles Serrano García

Tutora.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay unos que luchan muchos años, y son muy buenos.

Pero hay otros que luchan toda la vida,

esos son los imprecindibles”

Bertolt Brecht

Dedicado a mi Familia, a mi mamá, mi papá y a mi hermana,

Gracias por la espera y la paciencia en la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Ya son muchos años aquí, muchas experiencias vividas, mucha gente conocida que aportó algo a mi vida, y sobretodo personas que me han hecho crecer como persona y como profesional. Nunca me arrepentiré de haber tomado la decisión de viajar a conocer un nuevo país, a otro continente, y darme la oportunidad de vivir nuevas experiencias, nuevas culturas, creo que esas son riquezas que no te quita nadie y que te hacen ser una persona mejor. Aprovecho esta oportunidad para agradecer a muchas personas que han hecho que a pesar de las circunstancias, que esta etapa de mi vida sea inolvidable.

Quiero agradecer en primer lugar al Dr Faustino Mollinedo, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, por la confianza recibida y por mostrarme las cualidades que se requieren para poder pertenecer a este mundo de la ciencia, dedicación, paciencia e imaginación.

Agradecer también a la Dra Consuelo Gajate por su apoyo y disposición.

Agradecer al Dr Eugenio Santos, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, por darme la mano cuando más lo necesitaba, si no hubiese sido por esta oportunidad, seguramente este trabajo no hubiese podido ser posible.

Quiero dar las gracias a mis compañeros del laboratorio 6, a Rubén, Janny, Rósula Mariana, Álvaro, porque empezamos este camino juntos, y nos hemos apoyado como una pequeña familia y poco a poco hemos cumplido con nuestro objetivo. Por hacer del trabajo en el laboratorio una experiencia especial y más llevadera. A mi menina Sarita, por su dulzura y apoyo incondicional, a Vero por su sonrisa y positivismo, a Amaya por su apoyo y fortaleza, a Adolfo, por mostrarme la cara bonita de la ciencia, a Alberto por las largas charlas compartidas y por la confianza.

A mi querida gente del Laboratorio 1, A Sami, por confiar en mí y por ayudarme en el momento preciso, a Carmela por su sonrisa, por su gracia, por su apoyo y su preocupación por mí, a Pilar, porque no me dejó desfallecer y por la paciencia que me tuvo durante el tiempo de trabajo, a Fernando por su paciencia y su apoyo para hacer las cosas bien y mejor, a mi querida Alicia porque hemos pasado momentos difíciles juntas y nos hemos podido desahogar, estoy segura que para nosotras vendrán muchas cosas buenas y nos reiremos de todo lo pasado, a David y a Alberto por su confianza y apoyo, a Nuria por apoyarme en el trabajo y por su preocupación. Gracias chicos, ustedes son los mejores!

A mi equipo Quimera, por permitirme conocer este deporte, que más que deporte es un estilo de vida, por los campeonatos, por la fiesta, por la buena compañía y sobre todo por sacarme del laboratorio a desconectar un poco.

A mis editores, Nacho, Fernando y Carmela, por la paciencia y por enseñarme a escribir un buen "castellano" y hacer que este documento se entendiera. Se han ganado el cielo!

A mis amigos del alma a lo largo de este tiempo en Salamanca, a mis pequeñas Laura y Ángela, por ser mi pequeña familia durante los primeros años, por sus locuras, por sus sonrisas, por apoyarme cuando me sentía en el fondo y ayudarme a salir adelante. A mis albóndigas Lara y Diana, hemos pasado momentos duros juntas, y nos hemos apoyado sin condición, gracias por estar ahí siempre y gracias por la paciencia durante estos últimos meses. A Diego, porque a su manera me ha abierto los ojos y no me ha dejado perder la esperanza, gracias por estar siempre ahí apoyándome. A mi menina Joana, por apoyarme siempre, por estar en los momentos más duros de mi estancia aquí, por ofrecerme su familia y hacerme parte de ella. A Laura, mi uruguaya, por su sinceridad y sabio consejo. A Alejandra por su apoyo y su optimismo, y por escucharme siempre. A Magda, por animarme, por su sinceridad y sobre todo por hacerme creer que no era imposible. A Damián por su cariño y apoyo. A Carolina, por escucharme, apoyarme y por todos los buenos momentos vividos, A Ayxa, porque me apoyó y acompañó cuando más lo necesité. A María y Antonio, por adoptarme, por mostrarme el mundo de la música y darme a conocer lo bonito de este país que me acogió como a una más.

Se me ocurren un montón de nombres más, muchas gracias a todos, porque gracias a cada una de las experiencias que me he vivido con cada una de las personas que conocí aquí, recordaré mi estancia en Salamanca como una de las etapas más bonitas de mi vida.

Y por último y lo más importante a mi familia, porque han sido muchos años separados, por su apoyo incondicional y por darme la confianza en que podía llegar a cumplir esta meta. A mi mami por escucharme, apoyarme, y por sus oraciones, por creer en mí. A mi papi por ese cariño incondicional, por recordarme lo mucho que me extraña y lo importante que soy para él. A María Angélica, mi hermana y mi amiga, porque si no hubiese sido por su apoyo seguramente ahora no me encontraría donde estoy. Todos estos años lejos me han enseñado que puedes ser el mejor científico del mundo, pero si no tienes el apoyo de tu familia no eres nadie.

MUCHAS GRACIAS!!!

ABREVIATURAS

A

ADN: Ácido desoxi-ribonucleico

AIF: *Apoptosis inducing factor*

Akt III: Inhibidor de Akt III

Akt X: Inhibidor de Akt X

Akt/PKB: *Serine threonine kinase Akt/Protein kinase B*

APAF-1: *Apoptosis protease-activating factor-1*

ASK-1: *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

ATF6: *Activating transcription factor-6*

ATL: Lípidos antitumorales

ATP: Adenosin trifosfato

B

Bad: *Bcl-2 associated death promoter*

Bap31: *Bcl-2 associated protein 31*

BAPTA: 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

Bax: *Bcl-2 associated X protein*

Bcl-2: *B-cell-lymphoma 2*

Bcl-x_L: *B-cell lymphoma-extra large*

BH: *Bcl-2 homologue*

BHA: Butil-hidroxi-anisol

Bid: *BH3 interacting domain death agonist*

bp: Pares de bases

BSA: Albumina sérica bovina

t-Bid: *BH3 interacting domain death agonist truncated*

C

CARD: *Caspase recruitment domain*

CCC: Cáncer de cabeza y cuello

CD99: Cluster of differentiation 99 antigen

CF: Citometría de flujo

D

DAB: Diamino bencimida

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamino-2-fenil indol

DD: *Death domain*

DED: *Death effector domain*

DHE: Dihidroetidio

DIC: Imagen de contraste de interferencia diferencial

DiOC₆ (3): Ioduro de 3,3' diexiloxocarbocianina

DISC: *Death inducing signaling complex*

DMEM: Medio Eagle modificado

DMSO: Dimetil sulfoxido

DO: Densidad óptica

DR: *Death receptor*

DR4/5: *Death receptor 4/5*

DTT: Ditioneitol

E

(³H)-EDLF: Edelfosina marcada con tritio

ECL: *Enhanced chemoluminescence*

EDLF: Edelfosina

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

eIF2 α : *eukariotic translation initiation factor 2 α*

ERAD: *Endoplasmic reticulum associated degradation*

ERE: Estrés de retículo endoplasmático

Erk: Quinasa activada por estímulos extracelulares

ERPC: Erucilfosfolina

ES: Error estándar

ESFT: *Ewing Sarcoma Family of Tumors* (Familia de tumores de Ewing)

ET18OH: Análogo de edelfosina inactivo

Et-BDP-ET: Análogo fluorescente de EDLF

EWS-ERG: *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*

EWS-FL1: Proteína de fusión de Sarcoma de Ewing ("*Ewing Sarcoma Breakpoint region 1*")- (*Friend leukemia integration 1*")

F

c-FLIP: *FADD like IL1 β converting enzyme like protease*

FADD: *Fas-associated death domain*

FasL: Ligando de Fas

FC: Factor de crecimiento

FDA: *Food and drug administration*

FITC: *Fluorescein-isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FM: Fracción mitocondrial

FMN: Fracción mitocondrial y nuclear

G

GADD153: *Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153*

GAPs: *GTPase activated proteins*

GDP: *Guanosine di-phosphate*

GEFs: *Guanine nucleotide exchange factors*

GM1: Gangliósido GM1

Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*

GRP78: *Glucose related protein 78*

GST: Glutation-S-tranferasa

GTP: *Guanosine tri-phosphate*

H

H&E: Hematoxilina-eosina

HPLC-MS: *High performance Liquid Chromatography-mass spectrometry*

HRP: Peroxidasa de rábano

I

IAP: *Inhibitor of apoptosis family of proteins* (Familia de proteínas inhibidoras de apoptosis)

IF: Inmunofluorescencia

IFC: Inmunofluorescencia mediante microscopía confocal

IFN γ : Interferón γ

IGBP3: *Insulin Growth Binding Protein 3*

IGF-1: *Insulin growth factor-1* (Factor de crecimiento similar a insulina-1)

IGFR-1: *Insulin growth factor receptor-1*. (Receptor de Factor de Crecimiento Similar a Insulina)

IgG1: Inmunoglobulina G1

IHC: Inmunohistoquímica

IP: Ioduro de propidio

IPTG: isopropil β -D-tiogalactósido

IR: Receptor de Insulina

IRE-1: *Inositol required protein-1*

ITQ: Inhibidor tirosina quinasa

J

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

L

LC3: *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPS: Lipopolisacárido endotóxico

LR: Microdominios lipídicos de membrana "rafts"

LY294002: Inhibidor de PI3K (2-Morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one)

M

MAPKs: *Mitogen activated protein kinases*

MEK: *MAPK extracelular signal-regulated kinase*

MFI: *Mean fluorescence Intensity* (Intensidad de fluorescencia media)

MILTEF: Miltefosina

MPK: *MAPKs phosphatase*

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

m- β CD: metil- β -ciclodextrina

N

NEC: Necrostatina-1

pNA: p-Nitroanilida

P

PAF: *Platelet aggregation factor*

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PARP: *Poli-adenyl-ribose polymerase*

PBS: Tampón salino fosfato

PDGF: *Platelet derived growth factor*

PDK1: *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*

PERIF: Perifosina

PERK: *PKR like ER kinase*

PFM: Pre-fracción mitocondrial

PH: *Pleckstrin domain*

PI3K: *Phosphoinositide 3 kinase* (Fosfatidilinositol-3-quinasa)

PI3KCA: *Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*

PIP2: Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

PKA: *Protein kinase A*

PKB: *Protein kinase B*

PKC: *Protein kinase C*

PLC: Fosfolipasa C

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PNET: *Primitive Neuro Ectodermal Tumors* (Tumores neuro-ectodermicos primitivos)

PP2A: *Protein phosphatase 2 A*

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue.*

PVDF: *Polyvinylidene-fluoride*

R

RE: Retículo endoplasmático

RFP: *Red fluorescence protein*

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RTQ: Receptores tirosina quinasa

S

SAPKs: Proteínas quinasas activadas por estrés

SCF: *Stem cell factor*

SDS: Dodecil sulfato sódico

SE: Sarcoma de Ewing

Ser: Serina

SERCA: *Sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase*

SH2: *Src homology 2*

SHIP: *Src homology-2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase*

Sos: Son of sevenless

SP600125: Inhibidor específico de JNK *Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-one*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

T

TAB1: *TGF-beta-activated kinase 1*

TBE: *Tris-borate-EDTA buffer*

TBST: *Tris-buffered saline and Tween 20*

TGF- β : *Transformant growth factor- β*

Thr: Treonina

TNA: Translocasa de nucleótidos de adenina

TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

Tris: Tris (hydroxymethyl)aminomethane

U

U0126: Inhibidor específico de *MEK 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2aminophenylthio)butadiene*

UPR: *Unfolded protein response* (Respuesta a proteínas mal plegadas)

UV: Ultravioleta

V

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (Factor de crecimiento endotelio-vascular)

VEGF-R: *Vascular endothelial growth factor receptor* (receptor del factor de crecimiento endotelio-vascular)

VPH: Virus papiloma humano

W

WB: *Western-blot*

WHO: *World Health Organization*

X

XBP-1: *X-box binding protein-1*

XIAP: *X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*

Y

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

Z

z-DEVD-fmk: Benzyloxycarbonyl Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone (inhibidor específico de caspasa-3)

Ac-LEHD-fmk: Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-fluoromethylketone (inhibidor específico de caspasa-9)

z-LEVD-fmk: Z-Leu-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone (inhibidor específico de caspasa-4)

z-VAD-fmk: Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe) fluoromethylketone (inhibidor pan caspasa)

ÍNDICE

Abreviaturas

INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER	1
2. SARCOMA DE EWING	2
2.1. Epidemiología del Sarcoma de Ewing	2
2.2. Biología molecular y clasificación del Sarcoma de Ewing	3
2.2.1 <i>Genes diana de las proteínas EWS-ETS</i>	5
2.3. Rutas de señalización involucradas en el Sarcoma de Ewing	5
2.4. Terapia convencional del Sarcoma de Ewing	6
2.5. Terapia dirigida en Sarcoma de Ewing	7
2.5.1 <i>Inhibición de la proteína de fusión EWS-FLI1</i>	7
2.5.2 <i>Receptor del Factor de Crecimiento Similar a Insulina (IGF1-R) y rutas de señalización downstream</i>	7
2.5.3 <i>Receptores de muerte y sus ligandos</i>	8
2.5.4 <i>Inhibidores de mTOR</i>	9
2.5.5 <i>Inhibidores de la angiogénesis</i>	9
2.5.6 <i>Anticuerpo monoclonales dirigidos a CD99</i>	10
3. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	12
3.1 Definición	12
3.2 Epidemiología y factores de riesgo en cáncer de Cabeza y Cuello	12
3.3 Patología molecular de los tumores de Cabeza y Cuello	13
3.3.1 <i>Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)</i>	14
3.3.2. <i>Ruta de PI3K/Akt y m-TOR</i>	14
3.3.3 <i>Virus del Papiloma Humano</i>	15
3.3.4 <i>Ciclina D1</i>	15
3.3.5 <i>p53 y Reparación al daño al ADN</i>	15
3.4 Terapia convencional del cáncer de Cabeza y Cuello	16
3.5 Terapia dirigida en cáncer de Cabeza y Cuello	16
3.5.1 <i>Inhibidores del Receptor de crecimiento epidérmico</i>	16
3.5.2 <i>Inhibidores de la angiogénesis</i>	17

4. HOMEOSTASIS TISULAR	20
4.1 Apoptosis	20
4.1.2 <i>Rutas de señalización de la apoptosis</i>	21
4.1.3 <i>Caspasas</i>	25
4.1.4 <i>Regulación de la apoptosis</i>	26
4.2 Procesos de señalización de supervivencia y proliferación celular	28
4.2.1 <i>Ruta de señalización de PI3K/Akt</i>	28
4.2.2 <i>Papel de la ruta de señalización PI3K/Akt en cáncer</i>	30
4.2.3 <i>Ruta de señalización de las MAPKs</i>	32
5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN SUPERVIVENCIA Y MUERTE CELULAR	36
5.1 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	36
5.2 Chaperonas involucradas en estrés de retículo endoplasmático y degradación de proteínas	38
5.3 Función del estrés de retículo endoplasmático en apoptosis	38
5.3.1 <i>Relación del estrés del retículo endoplasmático con la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis</i>	41
6. MICRODOMINIOS LIPÍDICOS DE MEMBRANA “RAFTS”	44
6.1 <i>Papel fisiológico de los microdominios de membrana “rafts”</i>	45
7. LÍPIDOS ANTITUMORALES	49
7.1 Estructura y propiedades	49
7.2 Mecanismo de acción	51
7.2.1 <i>Efecto sobre el metabolismo de lípidos</i>	51
7.2.2 <i>Estrés en el retículo endoplasmático</i>	51
7.2.3 <i>Efecto sobre rutas de señalización</i>	52
7.2.4 <i>Actividad proapoptótica inducida por estrés celular</i>	53
7.2.5 <i>ATLs inducen el reclutamiento del receptor de muerte Fas/CD95 en los microdominios de membrana “rafts”</i>	54
7.2.6 <i>Efecto sobre la mitocondria</i>	54
7.3 Estudios Clínicos	56
OBJETIVOS	59

MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. MATERIALES	61
1.1 Líneas celulares	61
1.2 Cultivos celulares	61
1.2.1 <i>Medios de Cultivo</i>	61
1.3 Lípidos antitumorales evaluados	61
1.4 Anticuerpos	62
2. MÉTODOS	64
2.1 Cultivos celulares	64
2.1.1 <i>Preparación de soluciones stock de ATLS</i>	64
2.2 Cultivo de líneas celulares y evaluación de la actividad proapoptótica de los diferentes ATLS	64
2.3 Análisis de fragmentación del ADN y ciclo celular por citometría de flujo	64
2.4 Fragmentación de ADN en gel de agarosa	65
2.5 Obtención de imágenes de célula viva mediante microscopía invertida y secuencia de imágenes por “videomicroscopia time lapse”	66
2.6 Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE, Western blot, e Inmunodetección	66
2.7 Inhibición de la familia de caspasas	67
2.8 Ensayo de actividad JNK quinasa	68
2.8.1 Expresión de la proteína de fusión y purificación mediante cromatografía de afinidad	68
2.8.2 Ensayo quinasa	69
2.9 Inhibición de proteínas de la ruta de las MAPKs y PI3K/Akt	69
2.10 Localización de EDLF en Retículo Endoplasmático	70
2.11 Co-localización del receptor de membrana Fas en lipid <i>rafts</i>	71
2.12 Análisis del calcio citoplasmático por medición de Fluorescencia (FLUO-4)	71
2.13 Cuantificación de la liberación de citocromo c mitocondrial	72
2.14 Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometría de flujo	72
2.15 Inhibición de las ROS por tratamiento con antioxidantes lipídicos y efecto en la apoptosis	73
2.16 Estudio de incorporación de EDLF unida a tritio ($[^3\text{H}]$ -EDLF)	73
2.17 Análisis de expresión del receptor Fas/CD95 en la superficie celular mediante citometría de flujo	73

2.18 Estudio de la actividad antitumoral in vivo de EDLF en modelo de xenotransplante	74
2.19 Cuantificación de la EDLF en los órganos extraídos del ensayo <i>In vivo</i> (biodistribución) por HPLC-MS	74
2.20 Inmunohistoquímica de los tumores obtenidos en los ensayos <i>In vivo</i>	75
2.21 Aislamiento de microdominios de membrana “rafts”	77
2.22 Reducción de los niveles de colesterol de la membrana celular	78
2.23 Determinación de la integridad de la membrana celular	78
2.23.1 Incorporación de Ioduro de Propidio	78
2.23.2 Tinción con Trypan Blue	78
RESULTADOS	79
SARCOMA DE EWING	79
1. Citotoxicidad de ATLS en líneas celulares de Sarcoma de Ewing	79
2. Análisis del ciclo celular e inicio de la apoptosis en líneas celulares de Sarcoma de Ewing tras el tratamiento con EDLF	79
3. Activación de la maquinaria apoptótica por EDLF en líneas celulares de Sarcoma de Ewing	80
4. Implicación del estrés de retículo endoplasmático en la acción de EDLF en Sarcoma de Ewing	82
4.1 Papel del calcio en la respuesta apoptótica por tratamiento con EDLF	85
5. Efecto del tratamiento con EDLF sobre la ruta de señalización de las MAPK en Sarcoma de Ewing	86
5.1 Actividad JNK	86
5.2 Actividad Erk 1/2	87
6. Papel de la mitocondria en el mecanismo de acción de EDLF en Sarcoma de Ewing	88
7. Efecto antitumoral <i>In vivo</i> de EDLF en Sarcoma de Ewing	91
8. Papel del colesterol en la incorporación de EDLF en células de Sarcoma de Ewing	94
9. Reclutamiento de proteínas apoptóticas en dominios de membrana “rafts” tras el tratamiento de células de Sarcoma de Ewing con EDLF	95

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	97
1. Citotoxicidad de ATs en líneas celulares de cáncer de Cabeza y Cuello	97
2. Seguimiento del proceso de muerte celular por tratamiento con EDLF en líneas celulares de CCC por mediante videomicroscopía <i>Time-lapse</i>	98
3. Activación de caspasas en la apoptosis inducida por EDLF en líneas celulares de Cáncer de Cabeza y Cuello	99
4. Papel del retículo endoplasmático en el mecanismo de acción EDLF en cáncer de cabeza y cuello	100
5. Implicación de la mitocondria en el proceso de muerte de EDLF en líneas celulares de cáncer de Cabeza y Cuello	103
6. Activación de la proteína JNK como marcador de estrés celular en líneas de cáncer de Cabeza y Cuello	105
7. Implicación de la ruta de PI3K/Akt en el mecanismo de muerte celular de EDLF	106
8. Evaluación de mecanismos de muerte alternativos a la apoptosis producidos por EDLF en líneas celulares de Cáncer de Cabeza y Cuello	108
8.1 Necrosis	108
8.2 Autofagia	110
9. Implicación de los niveles de colesterol de membrana en la incorporación de EDLF y posterior inducción de apoptosis en líneas celulares de Cáncer de Cabeza y Cuello	111
DISCUSIÓN	113
SARCOMA DE EWING	113
I. Importancia de la respuesta apoptótica en el Sarcoma de Ewing	113
II. Evaluación de la actividad citotóxica de los ATs en Sarcoma de Ewing	114
III. Apoptosis como mecanismo principal de muerte en Sarcoma de Ewing inducida por EDLF	114
IV. Acumulación de EDLF en retículo endoplasmático e inducción de estrés de retículo como proceso inicial de la respuesta de muerte en Sarcoma de Ewing	115
V. Papel de la mitocondria en el mecanismo de acción de EDLF en el Sarcoma de Ewing	118

VI. Importancia de las especies reactivas de oxígeno en la muerte celular inducida por EDLF en células de Sarcoma de Ewing	120
VII. Implicación de las MAPKs en el mecanismo de muerte por EDLF en células de Sarcoma de Ewing	121
VIII. Microdominios lipídicos de membrana “rafts” en el mecanismo de acción de EDLF en células de Sarcoma de Ewing	123
IX. Estudio de la actividad antitumoral <i>in vivo</i> de EDLF en Sarcoma de Ewing	125
CANCER DE CABEZA Y CUELLO	126
I. Estudio de la actividad apoptótica de los ATLS en líneas cáncer de Cabeza y Cuello	126
II. Importancia de la incorporación de EDLF y su acumulación en el retículo endoplásmático en la inducción de apoptosis en cáncer de Cabeza y cuello	127
III. Papel de las ROS y de JNK en el mecanismo de acción de EDLF en cáncer de Cabeza y Cuello	128
IV. Implicación de la cascada apoptótica en el mecanismo de muerte de cáncer de Cabeza y Cuello por efecto de EDLF	128
V. Papel del retículo endoplásmático en el proceso apoptótico en células de cáncer de Cabeza y Cuello	129
VI. Función de la mitocondria en la apoptosis inducida por EDLF en células de cáncer de Cabeza y Cuello	130
VII. Liberación de calcio en la acción de EDLF en células de cáncer de Cabeza y Cuello	130
VIII. Distintos tipos de muerte celular inducidos por EDLF en células de cáncer de Cabeza y Cuello	131
IX. Inhibición de la señalización de Akt en la inducción de apoptosis por EDLF en células de cáncer de Cabeza y Cuello	133
X. IAPs en la inducción de apoptosis por EDLF en células de cáncer de Cabeza y Cuello	134
XI. Modelo del mecanismo de acción de EDLF en células de cáncer de Cabeza y Cuello	135
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO Nº 1: Videomicroscopía <i>Time-lapse</i>	Ver CD-Rom

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial; se le atribuyen 7,6 millones de defunciones ocurridas en 2008 (aproximadamente un 13% del total). Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual por cáncer son los siguientes: pulmón (1,4 millones de muertes), gástrico (736.000 de muertes), hepático (695.000 de muertes), colorectal (608.000 de muertes), mama (458.000 de muertes)(WHO- World Health Organization, 2013).

Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales seguirá en aumento y llegará a unos 13,1 millones en 2030 (WHO- World Health Organization, 2013). Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para su tratamiento se convierte en prioridad para la investigación en ciencias de la salud.

Tradicionalmente, el cáncer se ha considerado como una enfermedad debida a un crecimiento descontrolado de la célula tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Este crecimiento descontrolado es causado por múltiples cambios en la expresión génica que lleva a la desregulación entre la proliferación y la muerte celular. La proliferación descontrolada de estas células puede llevar a la invasión de otros tejidos produciendo metástasis en otros sitios anatómicos (Pelengaris S, 2013; Raymond, 2007). Bajo esta premisa, son múltiples los agentes quimioterapéuticos empleados para el tratamiento del cáncer cuyas dianas y mecanismos de acción afectan al DNA o al ciclo celular, inhibiendo así la proliferación de la célula cancerosa. El principal problema que presenta este tipo de compuestos es su poca selectividad, ya que inhiben la proliferación celular tanto de las células tumorales como la de las células normales de rápido crecimiento (la médula ósea, el epitelio gastrointestinal, las células de los folículos pilosos), y por lo tanto presentan una alta toxicidad y bajo índice terapéutico (Gajate & Mollinedo, 2002). Por esta razón, la investigación actual en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, está enfocada en la inhibición selectiva de las rutas de señalización implicadas en la proliferación y supervivencia, además de la búsqueda de nuevos compuestos que favorezcan la muerte específica de la célula tumoral (Holohan et al, 2013; Yap et al, 2010)

Este trabajo está enfocado especialmente en los tumores sólidos de sarcoma de Ewing (SE) y cáncer de cabeza y cuello (CCC), que a pesar de no tener una incidencia tan alta, como otro tipo de tumores, se caracterizan por su alta resistencia a la terapia disponible, además de su alto potencial metastásico, lo que hace que sean muy agresivos (Klein & Stoecklein, 2009; Klein & Grandis, 2010; Zhu et al, 2013).

2. SARCOMA DE EWING (SE)

Estos tumores se conocen como familia de tumores de Ewing (ESFT) y comprende tres grupos principales de tumores: el sarcoma de Ewing de tejido blando, los tumores neurectodermales primitivos (PNET) y los tumores de Askin (región toracolumbar). Todos los miembros de ésta familia de tumores comparten las mismas características histológicas, moleculares y citogenéticas (Balamuth & Womer, 2010; Bovee & Hogendoorn, 2009; Ludwig, 2008). Aunque inicialmente parecían ser biológicamente diferentes debido a su amplio espectro de diferenciación neural (siendo PNET el más diferenciado), inmunohistoquímicamente, citogenética y molecularmente son uniformes (Davies et al, 2009). Se ha llegado a un consenso que estos sarcomas son originados a partir de una única célula madre mesenquimal capaz de diferenciarse en varias líneas, la osteogénica, la adipogénica y la neurogénica (Jedlicka, 2010; Riggi et al, 2009). Por tanto, no es sorprendente que su respuesta a los mismos regímenes quimioterapéuticos sea idéntica (Bui & Zhang, 2010; Davies et al, 2009; Ludwig, 2008; Ross et al, 2013).

El SE es un tumor maligno de células pequeñas y redondas que se desarrolla principalmente en huesos y de manera menos frecuente en tejido blando. La población afectada por esta patología son niños y adolescentes principalmente (Balamuth & Womer, 2010; Ordonez et al, 2009).

En cuanto a su ubicación anatómica, se presentan principalmente en huesos largos (costilla, fémur, húmero) y pelvis. Este tipo de cáncer se caracteriza por su rápido crecimiento y alto potencial para desarrollar metástasis, principalmente en médula ósea, pulmón, y otros tejidos (Esiashvili et al, 2008; Jurgens & Dirksen, 2011; Ross et al, 2013)

2.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL SARCOMA DE EWING

Dentro del grupo de los pacientes con osteosarcoma, el porcentaje de niños diagnosticados con SE es del 34%, siendo el SE el segundo tumor de hueso más frecuente en adolescentes, (Burningham et al, 2012; Eyre et al, 2009). La edad de diagnóstico se suele presentar durante la segunda década de la vida, sin embargo, puede aparecer a edades tempranas (inferior a 6 años de edad) con una incidencia baja (0.6 por millón), presentándose un aumento considerable con la llegada de la pubertad a un promedio de 5 por millón (Herzog, 2005; Parkin et al, 1993).

Este tumor es más predominante en hombres que en mujeres (Herzog, 2005; Parkin et al, 1993), y su incidencia es heterogénea a nivel racial, presentándose la mayoría de casos en pacientes de raza blanca (incidencia 9 veces mayor) (Kaatsch, 2010) y menor en asiáticos e hispanos, siendo casi ausente en afro-americanos y africanos. Esta diferencia en la incidencia por raza sugiere la existencia de cierto componente genético que favorece la aparición de SE, sugiriéndose que este puede ser un factor importante (Ries L, 1999). De hecho, el único factor relevante está asociado a las translocaciones genéticas espontáneas, más que a exposiciones ambientales y fármacos, herencia mendeliana o traumas (Iwamoto, 2007; Ludwig, 2008). Tampoco se ha encontrado que esté asociado a alguna mutación genética o a algún síndrome de cáncer hereditario (Burningham et al, 2012).

La supervivencia a 5 años es baja (47%) en el caso de tumores de tejido blando y para los tumores de Ewing propiamente dichos es del 53% (Stiller, 2004; Stiller et al, 2013). Esta supervivencia puede disminuir considerablemente si el paciente se encuentra en estado metastásico (Esiashvili et al, 2008; Jurgens & Dirksen, 2011; Maheshwari & Cheng, 2010). La supervivencia en SE aumenta cuando la metástasis es pulmonar, a diferencia de la metástasis medular y de hueso. La mayoría de los estudios demuestran que del 30 al 40% de los pacientes con metástasis pulmonar aislada sobreviven 5 años, mientras que los pacientes con metástasis medular tienen una supervivencia a 5 años de tan solo el 20% (Esiashvili et al, 2008; Karosas, 2010).

2.2 BIOLOGÍA MOLECULAR Y CLASIFICACIÓN DEL SARCOMA DE EWING

Basado en las mutaciones genéticas asociadas a su desarrollo, los sarcomas se han subdividido en dos clases. Una de ellas está compuesta por un complejo de anomalías cariotípicas sin un patrón particular. La otra clase, en la que se encuentra el SE, compuesta por tumores asociados a una única translocación cromosomal $t(11;22)(q24;q12)$, que lleva a la formación del gen de fusión EWS-FLI1, lo que ocurre en un 85% de los casos (Álava, 2007; Bovee & Hogendoorn, 2009; Erkizan et al, 2010; Riggi & Stamenkovic, 2007). Esta translocación tiene lugar entre los exones centrales del gen EWSR1 (de "*Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1*"; cromosoma 22) con el exón del gen FL1 ("*Friend Leukemia Integration 1*"; cromosoma 11). En el 10% de los casos se detecta la translocación $t(21;12)(22;12)$, que lleva a la formación de la fusión EWS-ERG ("*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*", cromosoma 21) y $t(11;22)$ (Erkizan et al, 2010; Uren & Toretsky, 2005), mientras que el otro 5% puede tener otras posibles translocaciones con FEV, ETV1, y ETV4 (**Tabla Nº 1**). Cada una resulta en un gen de fusión que contiene una porción del gen EWS y un miembro de factores de transcripción de la familia Ets (**Figura Nº 1**). Además de proporcionar la clave para comprender la biología del SE, estas

translocaciones constituyen el criterio de diagnóstico más fiable (Riggi & Stamenkovic, 2007; Ross et al, 2013).

Translocaciones más comunes en ES		
Miembro EWS	Miembro ETS	Frecuencia (%)
EWS	FLI1	85%
EWS	ERG	10%
EWS	ETV1	<1
EWS	ETV4	<1
EWS	FEV	<1
TLS	ERG	<1

Tabla Nº 1: Principales translocaciones cromosomales de SE: Se ha descrito que la principal translocación es la EWS-FLI1 y se ha definido como el principal factor diagnóstico para esta patología (Riggi & Stamenkovic, 2007).

Se ha encontrado además que la expresión persistente de EWS/FLI1 es importante para mantener el fenotipo oncogénico de las células de ES (Erkizan et al, 2010; Hu-Lieskovan et al, 2005). En el mismo sentido, se ha demostrado que la inhibición endógena de la función de la EWS-FLI1 conlleva a una reducción de la transformación oncogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (Kovar et al, 1996; Lambert et al, 2000).

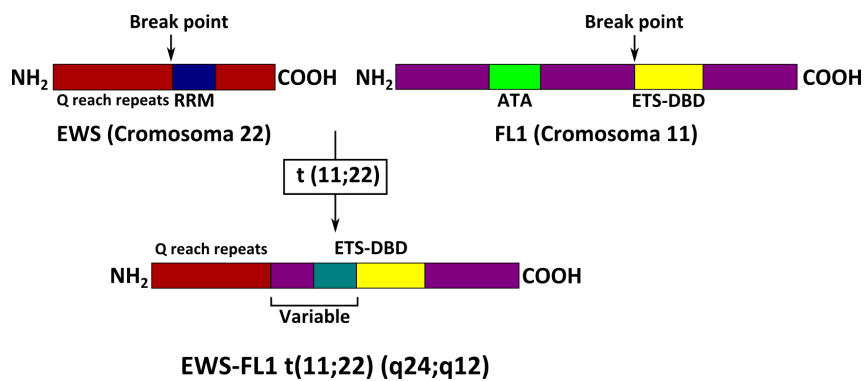


Figura Nº 1: Proceso de fusión de la proteína EWS-FLI1: Esta fusión resulta de la translocación cromosómica t(11;22). Esta proteína de fusión es el principal factor que altera las principales rutas de señalización de proliferación y supervivencia de la célula tumoral (Riggi & Stamenkovic, 2007).

2.2.1 Genes diana de las proteínas EWS-ETS:

Estas proteínas de fusión tienden a sobreexpresar genes involucrados en proliferación, diferenciación celular, resistencia a fármacos, control del ciclo celular, evasión de la inhibición del crecimiento, inmortalización, angiogénesis, adhesión, mantenimiento de la pluripotencia y supervivencia. Entre estos genes se encuentran *IGF1*, *NKX2*, *TOPK*, *SOX2*, *EZH2*, *CCND1*, *IGFBP3*, *GSTM4*, *p21* (Mackintosh et al, 2010) . Por otra parte, EWS-FLI1 tiende a reprimir genes involucrados en apoptosis y arresto en el ciclo celular incluyendo *IGFBP3*, *p57*, *p21*, *TGFβII* (Riggi & Stamenkovic, 2007; Ross et al, 2013; Sankar & Lessnick, 2011). La **Tabla N° 2**, describe con más detalle las principales dianas transcripcionales de la proteína EWS-FLI1

DIANAS TRANSCRIPCIONALES DE EWS-FLI 1				
Regulador transcripcional	Regulación ruta de señalización	Ciclo celular	Metabolismo	Angiogénesis-Matriz extracelular
EZH2	IGFBP3	Ciclina E	Uridina fosforilasa	VEGF-A
NROB1	PTPL1	p21	GSTM4	MMP-1
GLI1	Caveolina	p57 ^{KIP}		PLD2
Id2	hTERT	Ciclina D1		Tenascina C
EGR1	TGFβRII			
NKX2.2	AURKA			
	PDGFC			

Tabla N° 2: Principales dianas transcripcionales de la proteína EWS-FLI1. Cada una de estas dianas transcripcionales están implicadas en procesos de supervivencia, inhibición de la apoptosis, angiogénesis, metabolismo y ciclo celular. El conocimiento de estas dianas favorece la identificación de marcadores moleculares y dianas terapéuticas (Erkizan et al, 2010).

2.3 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN SARCOMA DE EWING

Conocer las principales rutas de señalización implicadas en la patogénesis del SE es importante para identificar posibles dianas terapéuticas para su tratamiento, además de nuevos factores pronóstico para la detección temprana de la enfermedad. Se han descrito cuatro rutas de señalización que se encuentran afectadas en el SE: moléculas de adhesión a la superficie (CD99), receptores tirosina-quinasa (RTQ), factores de crecimiento (FC), y factores de transcripción (Ordóñez et al, 2009) (**Figura N° 2**). Es importante saber que la transformación

aberrante de todas estas rutas de señalización se debe a la acción del grupo de las proteínas de fusión de SE, que actúan tanto a nivel transcripcional como con algunas proteínas clave de cada una de estas rutas (Mackintosh et al, 2010; Mateo-Lozano et al, 2006).

En líneas celulares de SE, se ha demostrado la activación constitutiva de los receptores de crecimiento similar a insulina (IGF1-R), del receptor de insulina (IR) y la sobreexpresión de sus respectivos ligandos (Cironi et al, 2008; Scotlandi et al, 2011). Esta activación se desarrolla por la activación autocrina y paracrina del receptor y sus ligandos, además de la inhibición de la proteína IGFBP3 (*insulin like growth factor binding protein 3*) (Benini et al, 2006; Toretsky et al, 2001). Además, se ha descrito una activación persistente de cada una de las rutas de señalización que se activan “*downstream*” del receptor (MAPK y PI3K/Akt), contribuyendo de manera importante en todos los efectos relacionados con proliferación y supervivencia tumoral de las células de SE (Benini et al, 2004; Chandhanayingyong et al, 2012; Hotfilder et al, 2005) (**Figura N° 2**).

Otra ruta importante en procesos de proliferación y migración celular que se encuentra afectada en líneas celulares de SE es la ruta de c-Kit, junto con su ligando de membrana SCF (*stem cell factor*). Este receptor se ha encontrado sobreexpresado en seis líneas celulares de SE (Scotlandi et al, 2003). Además, en estudios *in vivo*, se ha visto su aumento relacionado con la aparición de procesos metastásicos en pulmón y en la médula ósea (Landuzzi et al, 2000); esta activación induce la autofosforilación del IGFR-1, activando y potenciando la señalización de la ruta de PI3K/Akt (Blume-Jensen et al, 1998) (**Figura N° 2**).

2.4 TERAPIA CONVENCIONAL DEL SARCOMA DE EWING

Debido a la letalidad de este tumor, se ha recurrido a un enfoque agresivo multidisciplinario para su tratamiento. Este enfoque consiste en la combinación de cirugía, quimioterapia y radiación. Para la enfermedad localizada, la quimioterapia actual favorece la supervivencia a 5 años en un 60%. Dentro del arsenal terapéutico disponible está la doxorubicina, ciclofosfamida, ifosfamida, vincristina, actinomicina D y etopósido. El control local se hace mediante cirugía, la radioterapia se emplea solo en casos en los que la cirugía sea difícil (Bernstein et al, 2006; Iwamoto, 2007; Potratz et al, 2012; Ross et al, 2013). Para el estado metastásico, el régimen terapéutico es similar a la enfermedad localizada, sin embargo, la supervivencia de los pacientes con metástasis ósea o de médula y los pacientes con enfermedad recurrente es mucho menor (20% a 5 años) (Jurgens & Dirksen, 2011; Médica, 2013; Paulussen et al, 2009).

2.5 TERAPIA DIRIGIDA EN SARCOMA DE EWING

En la actualidad, la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del SE está enfocado a la selección de dianas moleculares específicas. Existe un gran interés por la búsqueda de nuevos tratamientos de esta patología, principalmente en el caso del SE recurrente (metastásico), debido a su agresividad y baja respuesta a la terapia empleada en los últimos años (Potratz et al, 2012).

Las principales dianas que están en evaluación se relacionan en primer lugar con la inhibición de la proteína de fusión EWS-FLI1, inhibiendo directamente la traducción de la proteína de fusión, que actúa como factor de transcripción (Lissat et al, 2012; McAllister & Lessnick, 2005; Tanaka et al, 1997). La inhibición de EWS-FLI1 desfavorece su unión a los diferentes genes diana, afectando así la transcripción de proteínas que definen la patogénesis del SE. De forma paralela, se están diseñando fármacos que actúen directamente en las rutas de señalización afectadas en SE (Chandhanayingyong et al, 2012; Hughes, 2009). Otra alternativa de tratamiento que se está estudiando es la inmunoterapia con células *natural killer* (Kelleher & Thomas, 2012).

A continuación se discutirá acerca de cada una de estas opciones terapéuticas, alguna de las cuales se encuentran actualmente en fase preclínica o en fase clínica I/II.

2.5.1 Inhibición de la proteína de fusión EWS-FLI1:

La proteína EWS-FLI1 afecta a distintos procesos importantes en la evolución del tumor: 1) transcripción de genes involucrados en la regulación del ciclo celular (Dauphinot et al, 2001), 2) reparación del DNA (Ferreira et al, 2007), represión y expresión de genes involucrados en la adhesión celular y migración (dianas como proteínas de unión a integrinas, polisacáridos, glucosamina o heparina), y 3) alteración en la expresión de varios genes apoptóticos (Kontny et al, 1998; Lissat et al, 2012). Debido a que EWS-FLI1 carece de actividad enzimática, recientes investigaciones en la terapia de SE se han dirigido a la interrupción de la interacción entre esta proteína de fusión y sus genes o proteínas de unión correspondientes (Kelleher & Thomas, 2012; Lambert et al, 2000; Maksimenko & Malvy, 2005)(Figura Nº 2).

2.5.2 Receptor del factor de crecimiento similar a insulina y rutas de señalización implicadas “downstream”

Los diferentes estudios se han dirigido a la búsqueda de inhibidores tanto del receptor IGF1-R, como inhibidores de la unión entre la proteína de fusión EWS-FLI1 al

promotor de IGFBP3 y activar la transcripción de esta proteína alterando la interacción del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) con su receptor (Benini et al, 2006; Kolb & Gorlick, 2009; Prieur et al, 2004). La inhibición de ésta ruta se ha realizado a través del uso de anticuerpo monoclonales o pequeños inhibidores de tirosina quinasa (Mora et al, 2011; Subbiah et al, 2009). El mecanismo de inhibición de este receptor y de las rutas de señalización implicadas “*downstream*” se muestra en la **Figura Nº 2**.

Existen estudios clínicos y preclínicos que evalúan el efecto terapéutico de la terapia dirigida al IGF1R o sus componentes “*downstream*” de la ruta. La inducción de apoptosis a través de la inhibición de IGF1R con un anticuerpo monoclonal se observó desde 1990. La terapia de combinación con agentes antitumorales como doxorubicina, rapamicina y tensirolimus aumenta la apoptosis (Beltran et al, 2011; Benini et al, 2001; Naing et al, 2012). Basados en estos resultados, varios anticuerpos contra IGF-1R están siendo desarrollados y están probados en estudios de fase I/II en pacientes con ES (Olmos et al, 2010). Sin embargo, se ha encontrado en varias líneas celulares que el tratamiento único con varios anticuerpos monoclonales han desarrollado mecanismos de resistencia a la actividad antitumoral de los mismos (Garofalo et al, 2012)

Entre otras de las estrategias terapéuticas están los inhibidores tirosina quinasa (*small tyrosine kinase inhibitors*, ITQ). Datos *in vitro* con estos inhibidores muestran una inducción de apoptosis y un arresto en G1 en líneas celulares de SE (Scotlandi et al, 2005). La terapia de combinación con vincristina o doxorubicina lleva al efecto aditivo de estos inhibidores, esto se demostró en estudios de xenotransplante en ratones (Martins et al, 2006). Otros estudios muestran que el silenciamiento de EWS-FLI1 en combinación con estos inhibidores tirosina quinasa, producen un efecto sinérgico en líneas celulares de ES (Herrero-Martin et al, 2009), confirmando que el bloqueo directo del IGF1R puede ser combinado con la inhibición de proteínas “*downstream*” de la ruta y así aumentar la respuesta terapéutica. En la **Figura Nº 2**, se muestran las rutas de señalización afectadas al emplear los inhibidores tirosina quinasa.

2.5.3 Receptores de muerte y sus ligandos

En diferentes líneas celulares de SE se ha descrito la expresión del receptor Fas/CD95 y su ligando FasL. Sin embargo, este receptor de muerte solo es funcional en algunas de esas líneas celulares. Estas mismas células al ser tratadas con cicloheximida o con interferón gamma (IFN γ), se observó la apoptosis de estas células mediada por el receptor Fas (Kontny et al, 1998). En contraste con la sensibilidad inconsistente de la apoptosis mediada por Fas en células de SE, se ha demostrado la alta sensibilidad que presenta las líneas celulares de SE a la apoptosis a través de la activación del receptor

de muerte TRAIL, debido a que expresan sus correspondientes receptores DR4 y DR5 *in vitro*. Sin embargo, una fracción de estas líneas celulares es resistente a la apoptosis inducida por TRAIL, debido a la baja o ausente expresión de caspasa-8 y la subsecuente inhibición de la cascada apoptótica. De forma interesante, se encontró un aumento en la expresión de la caspasa-8 tras el tratamiento con IFN γ (Fulda & Debatin, 2002; Kontny et al, 2001; Lissat et al, 2007; Mitsiades et al, 2001) (**Figura N $^{\circ}$ 2**).

En la actualidad, son cada vez más los estudios con diferentes agentes antitumorales que buscan favorecer la activación de la respuesta apoptótica a través de la activación de los receptores de muerte tanto Fas como TRAIL, tales como melatonina (Garcia-Santos et al), fenretinida (White & Burchill), interleucina-12 (Zhou et al, 2005), e inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) (Sonnemann et al, 2012).

2.5.4 Inhibidores de mTOR

Se ha encontrado que la rapamicina (inhibidor de mTOR), inhibe la proliferación de líneas celulares de SE, produciendo arresto en el ciclo celular y disminución en la regulación de la proteína EWS-FLI1, esta inhibición favorece la restauración de la señalización del receptor TGF β 2. El receptor TGF β 2 se encuentra reprimido transcripcionalmente por la proteína de fusión EWS-FLI1 en líneas celulares de SE, y la rapamicina es capaz de provocar un aumento en la expresión del m-ARN favoreciendo la inhibición en la proliferación que posee el TGF β (Kelleher & Thomas, 2012; Mateo-Lozano et al, 2003). Por otra parte, se ha encontrado que la combinación de rapamicina con oligonucleótidos antisentido para EWS-FLI1 llevan a una disminución significativa de los tumores de SE en modelos de xenotransplante (Mateo-Lozano et al, 2006) (**Figura N $^{\circ}$ 2**).

La hiperfosforilación de mTOR y otros mediadores como Erk y Akt, definen a un subgrupo de pacientes con SE. La inhibición combinada de IGF1-R y mTOR con cituxumumab (anticuerpo monoclonal anti-IGF1-R) y tensirolimus (inhibidor específico de esta proteína), lleva a la reducción en un 20% en el volumen de tumor en dos de tres pacientes con SE. Lo que sugiere que la terapia de combinación con inhibidores de mTOR pueden favorecer la supervivencia de estos pacientes (Naing et al, 2012).

2.5.5 Inhibidores de la angiogénesis

En varios estudios se ha encontrado un aumento en la expresión del factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF) y de su receptor (VEGFR), tanto en líneas celulares de SE como en tumores en modelos de xenotransplante, siendo el principal

factor del aumento en vasculogénesis (densidad microvascular) en el SE. Este aumento en la expresión del VEGF podría ser usado como diana potencial para el tratamiento en el SE, empleando anticuerpos monoclonales específicos para este receptor, además de su empleo en terapia combinada (Dalal et al, 2005; Zhou et al, 2007). Además se ha encontrado que en pacientes con SE se presentan niveles altos en la expresión de este receptor, sin embargo la expresión de este receptor es un factor pronóstico independiente de la supervivencia (Kreuter et al, 2006) (**Figura N° 2**).

2.5.6 Anticuerpos monoclonales dirigidos a CD99:

Uno de los marcadores específicos para el SE es la glicoproteína de superficie CD99 (Miyagawa et al, 2008). Se han probado diferentes anticuerpos monoclonales para CD99 y se ha observado una rápida inducción de apoptosis por mecanismos independientes de caspasas, lo que sugiere que la activación de esta proteína de superficie está implicada en procesos de adhesión y muerte en SE (Cerisano et al, 2004). Por otra parte se ha empleado la combinación del anticuerpo monoclonal anti-CD99 (0662) con doxorubicina en ratones atómicos, encontrándose un efecto sinérgico contra el crecimiento del tumor y la metástasis, con un aumento en la supervivencia (Kelleher & Thomas, 2012; Scotlandi et al, 2006). Estos estudios señalan las ventajas que puede tener la inmunoterapia en tratamiento de SE (**Figura N° 2**).

De acuerdo a toda la información mostrada anteriormente son múltiples las alternativas terapéuticas en las que se está investigando para el tratamiento de este tumor, específicamente en la inhibición de rutas de señalización implicadas en proliferación y supervivencia. Sin embargo, es necesaria la búsqueda de mecanismos que favorezcan la apoptosis de la célula tumoral de manera selectiva, además de reducir la posibilidad de eventos metastásicos, que en este caso son los casos con mayor resistencia a la quimioterapia actual.

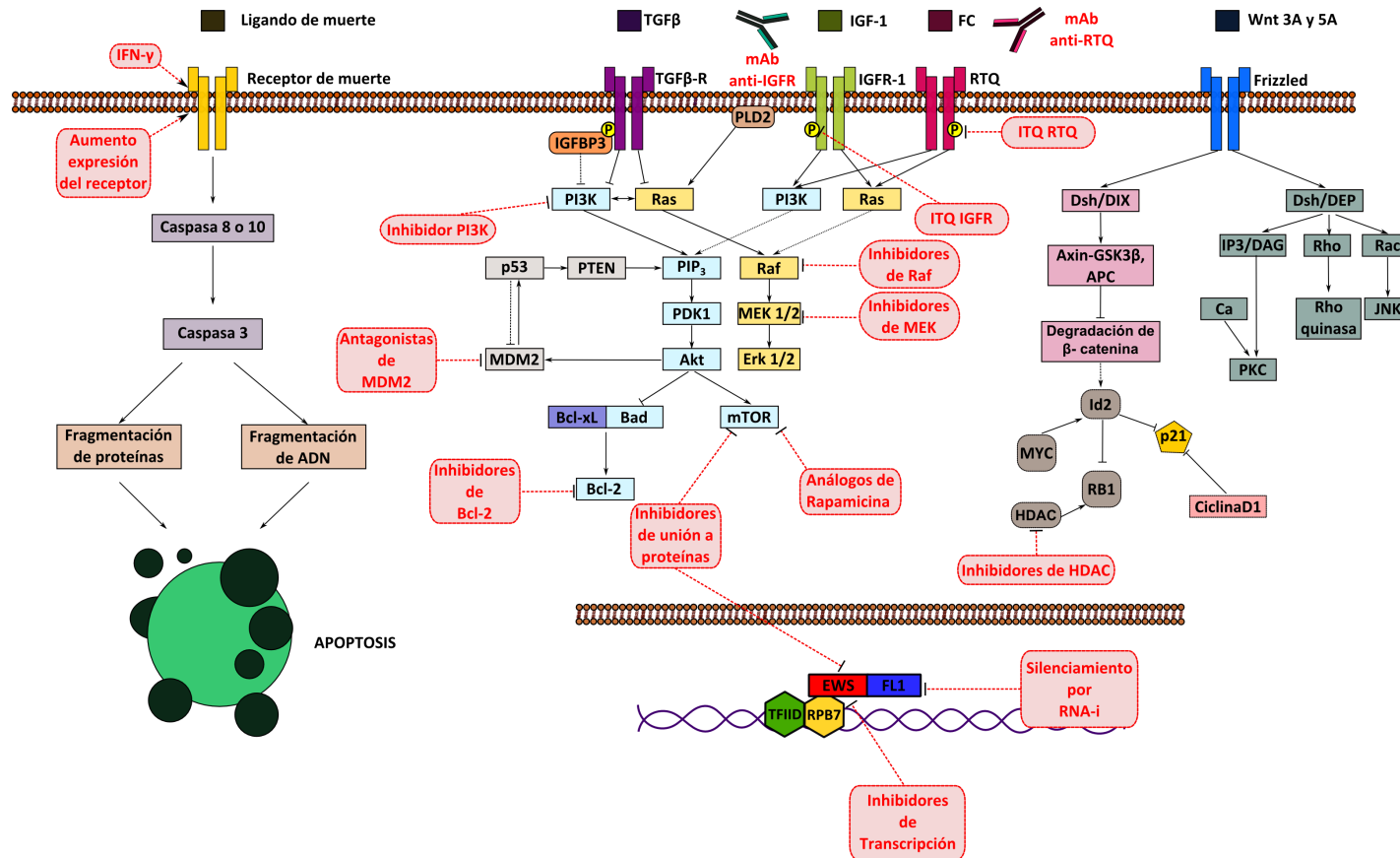


Figura Nº 2: Rutas de señalización implicadas en SE y principales agentes empleados en terapia dirigida. Se ha señalado que las principales rutas involucradas en la progresión tumoral del SE son la PI3K/AKT, MAPK por activación endógena del IGF-1R y Wnt. La identificación de dianas específicas de estas rutas ha permitido el desarrollo de diferentes alternativas terapéuticas que inhiben de manera específica proteínas implicadas en estas rutas de señalización inhibiendo la proliferación o supervivencia, o por otra parte el aumento en la expresión de receptores implicados en la muerte celular (García-Santos et al, 2012; Kontny et al, 2001; Mackintosh et al, 2010). RTQ: Receptor tirosina quinasa, ITQ: inhibidor tirosina quinasa, FC: Factor de crecimiento.

3. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

3.1 DEFINICIÓN

“Cáncer de Cabeza y Cuello” (CCC) es un término colectivo definido en base a la anatomía topográfica, para describir los tumores malignos del tracto aerodigestivo alto. Ésta región anatómica incluye la cavidad oral, faringe y laringe. El mayor subgrupo de los CCC son clasificados como cánceres orales (tumores presentes en las membranas mucosas de la boca, como el labio, la base de la lengua, la encía, el piso de la boca y el paladar) y de faringe (comprende orofaringe, hipofaringe y nasofaringe). El término “cáncer de cabeza y cuello” está restringido a carcinomas de célula escamosa en ésta región anatómica, que además de compartir muchos de los factores de riesgo, son similares en su epidemiología tratamiento y pronóstico (Hernandez, 2007; NIH, 2013).

La tumorigénesis se da como resultado de la acumulación sucesiva de alteraciones genéticas moleculares en el epitelio escamoso del tracto aerodigestivo superior. La progresión del estado tardío de displasia a carcinoma invasivo se da a través de una serie de cambios complejos estructurales y celulares que son el resultado de la desregulación de rutas clave activadas por la interacción del epitelio y los elementos estromales del huésped (El-Naggar, 2011; Leemans et al, 2011; Stadler et al, 2008).

3.2 EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO (CCC)

Dentro de las estadísticas internacionales, el cáncer de cabeza y cuello (CCC) está clasificado como el sexto tipo de tumor más común (Dobrossy, 2005; IARC, 2008). Se han reportado 650.000 nuevos casos por año y 350.000 muertes por año a nivel mundial (El-Naggar, 2011; Johnson & Amarasinghe, 2011). Dentro de la clasificación de cada uno de los tumores que pertenecen a este grupo, el tumor con mayor incidencia es el oral, seguido del cáncer de faringe y laringe (Curado & Hashibe, 2009; Dobrossy, 2005).

Diferentes estudios han demostrado una relación directa entre la aparición de CCC y varios factores de riesgo relacionados con el estilo de vida, factores ambientales, socio-económicos y geográficos. En primer lugar, se ha descrito que el consumo de tabaco y alcohol es el origen del 60% de los tumores orales en hombres y 30% en mujeres (Dobrossy, 2005; Hecht, 2003; Johnson & Amarasinghe, 2011). La principal causa por la cual el tabaco genera este tipo de cáncer es el alto contenido de compuestos carcinogénicos producto de su combustión, que favorecen la formación de aductos con el ADN, además de la generación de

estrés oxidativo a nivel celular causando daño a proteínas, carbohidratos y ADN generando mutaciones (Hecht, 2003; Johnson & Amarasinghe, 2011). Por otra parte, el causante principal de la actividad cancerígena del alcohol es la producción del metabolito acetaldehído obtenido por transformación hepática. Este metabolito tiene altos efectos mutagénicos, además de su efecto hepatotóxico al afectar a la glutatión-S-transferasa y el citocromo P450 (Deshpande & Wong, 2008; Lubin et al, 2009).

Por otra parte, el virus papiloma humano (VPH) se ha asociado al cáncer de cuello uterino, sin embargo, en los últimos años se ha descrito la asociación entre el VPH y el CCC por la presencia de determinados marcadores moleculares; estos marcadores dependen de la población de origen, la combinación de subtipos presentes y el método de detección. Se ha encontrado que el tipo más común de VPH en muestras tumorales es el tipo 16 (VPH16), al igual que en muestras cervicales (Brumbaugh et al, 2011; Syrjanen et al, 2011).

Otro de los factores que se ha asociado a la aparición de cáncer oral, es el consumo del *buyo de betel*. Esta preparación está compuesta por las hojas del árbol de betel, nuez de areca y cal siendo ampliamente usada en países como India y Malasia por su efecto estimulante. Sin embargo, la presencia de compuestos con potencial cancerígeno, como el safrol y las nitrosaminas en esta preparación, son la causa de la aparición de mutaciones y desarrollo tumoral (Ho et al, 2002; Johnson & Amarasinghe, 2011; Lee et al, 2005; NIH, 2013).

3.3 PATOLOGÍA MOLECULAR DE LOS TUMORES DE CABEZA Y CUELLO (BIOMARCADORES)

A nivel molecular existe variedad de rutas de señalización afectadas en el CCC que son las que dan sus características patológicas y de resistencia a las terapias disponibles. Es importante indicar que las alteraciones moleculares presentes en el CCC son causadas en su mayoría por los factores de riesgo descritos anteriormente y se van presentando durante el proceso de progresión tumoral, por esta razón, han sido empleados como marcadores específicos de diagnóstico (Freudlsperger et al, 2010). A nivel celular se van alterando procesos como la proliferación celular, angiogénesis, adhesión celular, arrestos en el ciclo celular, evasión de la apoptosis, hipoxia, entre otros. Las rutas de señalización alteradas en CCC incluyen el p53, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de transcripción STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) y el receptor del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR) (Deshpande & Wong, 2008; Kalyankrishna & Grandis, 2006) (**Figura Nº 3**). Estas proteínas son clave para el estudio de potenciales dianas terapéuticas. A continuación se describen cada una de las rutas alteradas en este tipo de tumor.

3.3.1 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR es conocido como un marcador pronóstico importante de la aparición y progresión, así como de la supervivencia en el CCC. Es así como se ha encontrado la sobreexpresión de este receptor en el 90% de los tumores comparado con el tejido normal (Freudlsperger et al, 2010; Wrangle et al, 2011). De la misma manera, se ha observado que la sobreexpresión de EGFR en tumores de estado avanzado y en tumores con menor grado de diferenciación está relacionada con la agresividad, disminución en la supervivencia y resistencia a la terapia actual y dirigida (Kalyankrishna & Grandis, 2006; Stadler et al, 2008). Por otra parte, se ha asociado el nivel de sobreexpresión de este receptor con la zona anatómica donde se encuentra el tumor, por ejemplo, la expresión del EGFR es mayor en tumores de la cavidad oral y orofaríngeo comparado con el cáncer de laringe (Stadler et al, 2008; Takes et al, 1998; Won et al, 2012).

Se ha descrito una mutación del gen del EGFR en el 42% de los casos de CCC (mutante *EGFRvIII*), esta mutación se caracteriza por tener una supresión de los exones 2-7 del gen del EGFR que codifican para la región extracelular del receptor, y que provoca una activación constitutiva de receptor, siendo totalmente independiente a su activación por ligando (Deshpande & Wong, 2008; Sok et al, 2006; Stadler et al, 2008) (**Figura N° 3**).

3.3.2 Ruta de la PI3K/Akt y mTOR

Se han encontrado mutaciones somáticas en el oncogen PI3KCA (*Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*) entre el 20-30% de los pacientes de CCC. Estos cambios generan un aumento en la actividad quinasa de la PI3K, generando un aumento en la invasión y migración de las células. Por otra parte, se ha descrito que en el 10% de los pacientes existen mutaciones o deleciones homocigóticas que llevan a la inactivación de PTEN (Won et al, 2012). Esto implica que al desactivar PTEN, la inhibición de la ruta de PI3K no se lleva a cabo. En consecuencia, se generará una activación persistente de Akt, que producirá un aumento en la supervivencia, progresión y transformación celular. Se ha definido la mutación en PI3KCA y la inactivación de PTEN como marcadores con potencial predictivo (Deshpande & Wong, 2008; Stadler et al, 2008; Wrangle et al, 2011) (**Figura N° 3**).

3.3.3 Virus del Papiloma Humano

El principal tipo de VPH asociado con CCC es el tipo 16, que también está relacionado con el cáncer de cuello uterino y vulvar (Best et al, 2012). El VPH16 se ha identificado como un factor pronóstico de supervivencia en el CCC, ya que resulta ser más sensible a la quimio y radioterapia a diferencia del CCC de pacientes VPH negativo (Gillison et al, 2008; Gillison et al, 2000). El CCC tipo VPH16 tiene diferentes perfiles de riesgo, presentación clínica, biología y morfología tumoral, lo que le hace diferente con respecto a los tumores de pacientes cuyo factor de riesgo es el tabaquismo (D'Souza et al, 2007; Gillison et al, 2008).

El mecanismo molecular por el cual el VPH produce la transformación maligna en la célula es iniciado por la incorporación del ADN viral en el núcleo de la célula huésped, posteriormente codifica para los oncogenes virales E6 y E7 y desregula la producción de las respectivas proteínas oncogénicas (Rautava & Syrjänen, 2012). La proteína E6 está implicada en la ubiquitinación y degradación de p53 que favorece la supervivencia celular y la proteína E7 se une y activa la proteína de retinoblastoma, generando cambios en las proteínas de ciclo celular así como un aumento en la regulación de p16 y disminución en la expresión de la ciclina D1 (**Figura Nº 3**). Estos cambios se reflejan en un aumento de la proliferación y en la transformación maligna de la célula. Así mismo, estos cambios moleculares se presentan en etapas tempranas de la transformación oncogénica (Leemans et al, 2011; Tran et al, 2007).

3.3.4 Ciclina D1

En pacientes con CCC se han descrito polimorfismos en CCND1 (gen que codifica para ciclina D1) (Holley et al, 2005; Nakashima et al, 2005). Las alteraciones en este gen se encuentran asociadas con el desarrollo normal de la enfermedad, el grado del tumor y el riesgo de recurrencia (Akervall et al, 1997; Wrangle et al, 2011).

3.3.5 p53 y reparación al daño del ADN

La mutación en p53 se encuentra en más de la mitad de los tumores malignos, es un elemento crítico en la regulación del ciclo celular. Se han encontrado mutaciones en TP53 (gen que codifica para la proteína p53) con una prevalencia del 40-80% (Wrangle et al, 2011). La inactivación de p53 en el cromosoma 17q13 lleva a una falta en el control del crecimiento y deja a las células incapaces de responder al estrés o al daño al ADN (Klein & Grandis, 2010). En tumores de CCC, VPH positivos de tipo 16, se ha encontrado que el mecanismo de

pérdida de p53 es causado por la ubiquitinación de ésta proteína por parte de la proteína E6 viral (Klein & Grandis, 2010; Pai & Westra, 2009; Rautava & Syrjänen, 2012) (**Figura Nº 3**).

3.4 TERAPIA CONVENCIONAL DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El tratamiento de los tumores de CCC incluye principalmente la cirugía, radioterapia y quimioterapia, tanto su uso individual como el tratamiento combinado. El empleo de los diferentes protocolos depende del estado de la enfermedad, desde tumor localizado hasta metástasis y tratamiento paliativo. En lo posible se busca mantener la funcionalidad del órgano para el beneficio del paciente (Lango, 2009; Stevenson, 2011). En estados iniciales de la enfermedad (I o II) se emplea principalmente la resección definitiva del tumor o eliminación por el empleo de radiación. La radiación se emplea principalmente en los casos en que los pacientes no toleren la cirugía (Stevenson, 2011). Para los casos con un nivel más avanzado (III-IV) de la enfermedad se considera el uso de cirugía junto con protocolos de quimioterapia que incluyen varios ciclos de fármacos como el cisplatino, cetuximab, paclitaxel, 5-fluoruracilo, y carboplatino (Bernier et al, 2011; Stevenson, 2011). En el estado avanzado de la enfermedad se suele emplear un agente simple o terapia de combinación, si el paciente es tolerante a la terapia basada en compuestos de platino. Se hace también el uso de cetuximab, y metotrexato como primera línea de tratamiento (Stevenson, 2011). Se ha observado que pacientes con etiología relacionada con el tabaquismo y el alcohol responden peor que los pacientes cuya enfermedad está asociada a la infección crónica del VPH cuya respuesta biológica es más favorable (Chung & Gillison, 2009; Gillison et al, 2000).

3.5 TERAPIA DIRIGIDA EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Actualmente la investigación relacionada con la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento del CCC está enfocada a la mejora de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, especialmente en pacientes en estado metastásico, cuya resistencia a los tratamientos empleados actualmente cada vez son más frecuentes. Por otra parte, se está haciendo mayor énfasis en la terapia dirigida a los principales marcadores moleculares implicados en la progresión tumoral para encontrar terapias más selectivas (**Figura Nº 3**).

3.5.1 Inhibidores del Receptor del factor de crecimiento epidérmico

El bloqueo de esta ruta de señalización está siendo investigada ampliamente como estrategia racional y dirigida para este tumor y otro tipo de tumores sólidos (Martinelli et al, 2009). Existen dos categorías de compuestos que se encuentran en estudio para inhibir esta ruta de señalización. En primer lugar se encuentran los anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio de unión al ligando e

interfiere con la activación del receptor. Por otra parte, están los inhibidores tirosina quinasa que se unen a la región citoplasmática del receptor e interfieren con la señalización “downstream” de la cascada de señalización (**Figura N° 3**).

3.5.1.1 Anticuerpos monoclonales:

Son los agentes más investigados y empleados actualmente en clínica para el tratamiento de CCC en estado locoregional avanzado y metastásico.

El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/murino del isotipo IgG1 que se une al EGFR con una afinidad mucho mayor a su ligando endógeno, previniendo la dimerización internalización y autofosforilación del mismo e inhibiendo la activación subsecuente de la ruta de señalización mediada por su actividad tirosina quinasa (Martinelli et al, 2009). Esta inhibición tiene como consecuencia, arresto del ciclo celular, activación de la señalización apoptótica, efectos antiangiogénicos, inhibición de la invasión celular y metástasis (Freudlsperger et al, 2010). Por otra parte, al estar asociado al isotipo IgG1, cetuximab presenta actividad citotóxica asociada a anticuerpos, contribuyendo a la actividad antitumoral (Lopez-Albaitero et al, 2009). Se ha encontrado igualmente que este anticuerpo inhibe la internalización nuclear del receptor previniendo la activación de los mecanismos de reparación del DNA que protege a la radiación de las células o del daño al DNA inducido por la quimioterapia (Markovic & Chung, 2012; Martinelli et al, 2009) (**Figura N° 3**).

- **Inhibidores Tirosina Quinasa:**

Actualmente se están desarrollando moléculas que se unen intracelularmente al receptor EGFR impidiendo la actividad tirosina quinasa, impidiendo la fosforilación de PI3K. Los inhibidores que se encuentran más avanzados a nivel clínico están el erlotinib y gefitinib. Inicialmente se han evaluado estos inhibidores en monoterapia, pero no se ha logrado un aumento considerable en la supervivencia de los pacientes con enfermedad localizada. En la actualidad se están realizando estudios de estos inhibidores en combinación con taxanos, cisplatino, y agentes anti EGFR (Gold et al, 2009; Markovic & Chung, 2012) (**Figura N° 3**).

3.5.2 Inhibidores de la angiogénesis

La angiogénesis es un mecanismo importante para la progresión tumoral y la metástasis. En varios tumores sólidos, incluido el CCC se ha demostrado la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR), que favorece

la vascularización tumoral y el crecimiento celular. Actualmente, se están desarrollando inhibidores específicos que bloqueen el proceso de vascularización. Como estrategia principal se están desarrollando agentes que inhiban tanto al factor de crecimiento como al receptor tirosina quinasa (**Figura N° 3**).

El inhibidor más desarrollado en clínica es el anticuerpo monoclonal Bevacizumab (Avastin®; Genetech), su mecanismo de acción principal es la unión y secuestro de las cinco isoformas del VEGF. Este anticuerpo está aprobado por la FDA (*food and drug administration*) para el tratamiento de otro tipo de tumores sólidos (colorectal, pulmón, y mama) (Ferrara et al, 2004).

Varios ensayos clínicos han llegado a la conclusión que este tipo de inhibidores son más eficaces cuando se emplean en combinación que en monoterapia, ya que la angiogénesis es un mecanismo alternativo que favorece el desarrollo tumoral y no es el mecanismo principal del desarrollo tumoral. Se ha descrito que el uso de estos inhibidores genera un aumento en la activación del EGFR como mecanismo de compensación, por lo que se ha propuesto realizar la inhibición de ambos receptores, observándose aumento en la apoptosis y disminución en la proliferación y permeabilidad vascular (Gold et al, 2009).

Se ha encontrado una acumulación aberrante de la proteína S6 activada (p-S6) en pacientes con CCC y líneas celulares derivadas (Liao et al, 2011). Esta proteína ribosomal disminuye cuando las células son tratadas con rapamicina, este efecto también se ha observado en modelos *de xenotransplante* (Amornphimoltham et al, 2005). El efecto *in vivo* de la rapamicina incluye inducción de la apoptosis e inhibición del crecimiento celular de las células de CCC, con la subsiguiente reducción del tumor. En algunas líneas celulares se ha encontrado que la inhibición de EGFR (anticuerpos monoclonales) no ha tenido efecto sobre la actividad de la ruta de mTOR, por lo que podría usarse en combinación con inhibidores de mTOR (Amornphimoltham et al, 2005).

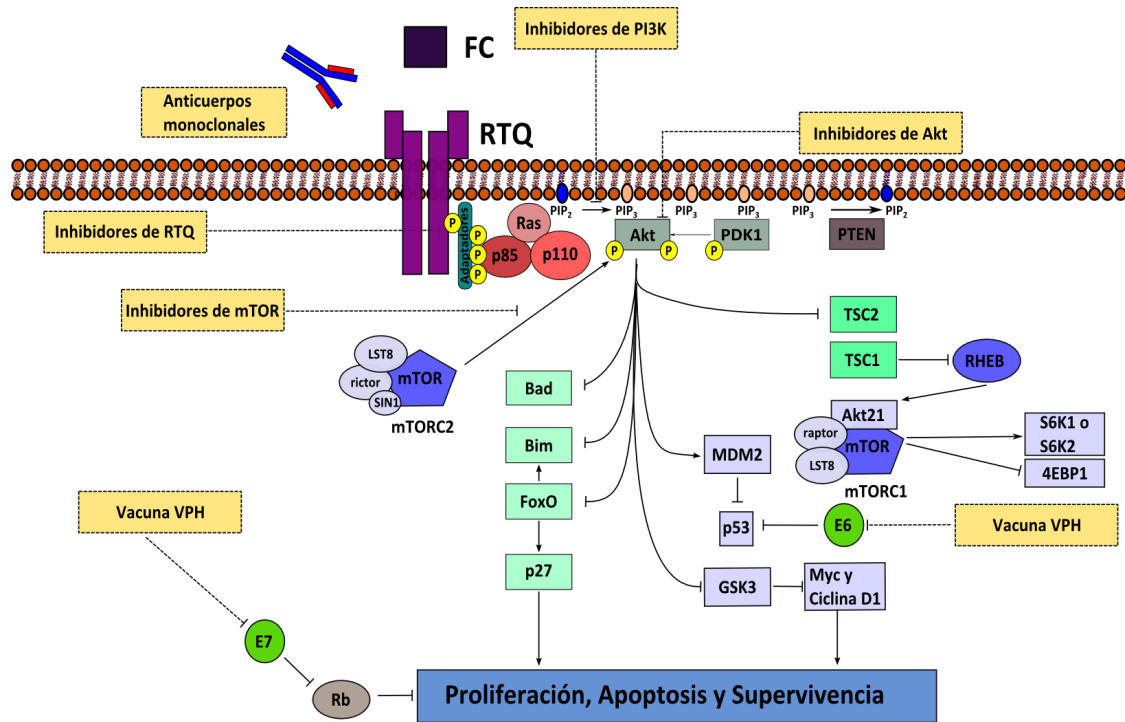


Figura N° 3: Rutas de señalización implicadas en el desarrollo del HNSCC y nuevas dianas terapéuticas. FC: Factores de crecimiento (EGF, VEGF), RTQ: Receptores tirosina quinasa (EGFR, VEGFR). El enfoque de terapia dirigida va encaminado a la inhibición selectiva de moléculas clave de la ruta de señalización PI3K/Akt (Fung & Grandis; Howard et al; Leemans et al, 2011; Stadler et al, 2008).

4. HOMEOSTASIS TISULAR

La homeostasis tisular es el equilibrio fisiológico establecido en los tejidos para el correcto funcionamiento del organismo. Este equilibrio responde a diferentes mecanismos celulares encargados tanto de la proliferación y supervivencia celular como a mecanismos de muerte celular programada. Cualquier desbalance entre estos mecanismos puede causar múltiples patologías (Carson & Ribeiro, 1993; Danial & Korsmeyer, 2004). Es el caso del cáncer, donde mecanismos de proliferación y muerte celular se encuentran alterados, ya que las células responden de manera amplificada a las señales de proliferación y supervivencia, y de la misma manera son capaces de evadir la respuesta apoptótica. En contraste, existe otro tipo de patologías degenerativas en el que las células no responden a estas señales de supervivencia y por tanto son más susceptibles a los mecanismos de muerte celular, como es el caso de enfermedades como el Alzheimer, infarto agudo al miocardio y fallo hepático entre otras.

A continuación se hará una descripción de las rutas de señalización implicadas tanto en la proliferación y supervivencia, así como la señalización de muerte celular. De la misma manera, se describirá la implicación de estas rutas en la progresión tumoral.

4.1 APOPTOSIS

Este mecanismo de muerte celular fue descrito inicialmente por Kerr y col. en 1972. El término apoptosis proviene del latín *apo* (aparte, lejos) y *ptosis* (caída, desgracia, cadáver) (Kerr et al, 1972), y describe un tipo de muerte celular programada por el organismo, codificada genéticamente y que no da lugar a una respuesta inflamatoria. Se caracteriza por ser un proceso altamente controlado con el fin de eliminar las células sin necesidad de propagarse a las células que se encuentran alrededor. Existen múltiples mecanismos que regulan la inducción de este mecanismo letal, entre ellos se encuentran factores de crecimiento, mediadores intracelulares de transducción de señales y proteínas nucleares reguladoras de la expresión genética (Taylor et al, 2008). La alteración de este equilibrio proliferación-muerte es la base patológica de muchas enfermedades como es el caso del cáncer, enfermedades autoinmunes (deficiencia en la muerte celular) y enfermedades neurodegenerativas (aumento en la muerte celular)(Carson & Ribeiro, 1993; Elmore, 2007; Fischer & Schulze-Osthoff, 2005).

Las razones principales por la que la maquinaria apoptótica puede ser activada son el mantenimiento de la homeostasis celular y/o la activación en respuesta al daño celular. Este daño puede ser causado por agentes que causan daños en el material genético, generando un aumento de p53 y la activación de su ruta de señalización. Estos agentes pueden ser radiación, reacción a especies reactivas de oxígeno (ROS), fármacos, infección vírica, hipoxia,

activación oncogénica, depleción de ribonucleótidos, exposición a óxido nítrico, entre otros (Ehrhardt et al, 2008; Pluquet & Hainaut, 2001).

Una vez activada la respuesta apoptótica la célula, sufre una serie de cambios morfológicos que conducen a la muerte celular de manera controlada (sin activar la respuesta inflamatoria). Estos cambios morfológicos son empleados en la identificación cualitativa de la muerte por apoptosis. Inicialmente se produce una contracción de la célula con el subsecuente rompimiento de la unión célula-célula en el tejido, durante este proceso la célula mantiene intactos sus orgánulos, sugiriendo que la actividad metabólica de la célula permanece activa durante este tiempo (Campo, 2009). A continuación, se produce la condensación de la cromatina en el núcleo, generando áreas de forma creciente contorneando la membrana nuclear interna (Pyknosis). Este evento es generado por la escisión de las láminas nucleares. Posteriormente, ocurre la fragmentación del ADN por parte de las endonucleasas, obteniendo fragmentos múltiples de aproximadamente 180 bp. Posteriormente, se inicia la fragmentación de otros organelos como el Golgi, mitocondria y retículo endoplasmático. Como proceso final, el núcleo empieza a romperse en fragmentos y así mismo la célula empieza a fragmentarse en un número de pequeños cuerpos apoptóticos para que se pueda llevar a cabo la remoción fagocítica; durante este proceso los macrófagos migran fagocitando los fragmentos celulares sin generar respuesta inflamatoria (Elmore, 2007).

4.1.2 Rutas de señalización de la apoptosis

Existen dos vías principales por las cuales se lleva a cabo el proceso apoptótico. Cada una de estas rutas puede primar sobre la otra o complementarse para potenciar la activación de la cascada apoptótica dependiendo del tipo celular.

- **Ruta extrínseca:**

La activación de la cascada apoptótica se inicia a través de los receptores de muerte que responden y son regulados por sus respectivos ligandos, ordenando a la célula la activación de la maquinaria de muerte (“Apoptosis instructiva”) (Fulda & Debatin, 2006).

Los receptores de muerte son proteínas transmembrana. Contienen una homología significativa en la región extracelular (N-terminal) rica en repeticiones de cisteína donde se une el correspondiente ligando; y en la región intracelular (C-terminal) poseen una secuencia de 60-80 aminoácidos conocida como *dominio de muerte* (DD: *death domain*) donde se reclutan las proteínas que activan la señalización apoptótica. Los receptores de muerte pertenecen a la familia de receptores del

factor de necrosis tumoral (TNF-R). Los componentes principales de esta familia son: Fas (CD95/APO1), DR4 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-1, TRAIL-R1*) y DR5 (*TRAIL-R2*). Estos receptores están presentes en la mayoría de tejidos, mientras que sus ligandos son expresados bajo estímulos de estrés solo en determinados tipos celulares (Guicciardi & Gores, 2009).

El mecanismo de activación de estos receptores se da a través de su trimerización y ensamblaje junto con otras proteínas de muerte para formar un complejo que induce la señalización de muerte (DISC, *Death inducing signaling complex*). Este proceso ocurre en la parte citoplasmática de la membrana. Una vez se han activado los receptores de muerte y se ha formado el complejo DISC, se da inicio a la activación de una cascada de proteasas “*downstream*” que son las encargadas de iniciar el proceso proteolítico (Campo, 2009). La formación del complejo DISC se produce una vez los receptores de muerte son activados, inicialmente se produce el acoplamiento de la proteína adaptadora FADD (*Fas-associated protein with death domain*) a través del dominio de muerte del receptor. La proteína FADD tiene un dominio efector de muerte único (DED, *death effector domain*) que es el que permite el acoplamiento de las procaspasas iniciadoras (caspasas-8 y -10), mediante la unión con el DED de la caspasa. Esta unión de estas caspasas al complejo DISC favorece su auto-fragmentación y activación para dar inicio al proceso proteolítico masivo. La actividad proapoptótica del complejo DISC puede ser inhibida por la proteína c-FLIP que impide la unión de la caspasa-8 al complejo, inhibiendo su activación (Guicciardi & Gores, 2009). El proceso de activación de la ruta extrínseca de la apoptosis se muestra en la **Figura N° 5**.

- **Ruta intrínseca o mitocondrial:**

La activación de esta ruta de la apoptosis se produce específicamente en la mitocondria. Existen múltiples causas por las que esta ruta de señalización puede ser activada. En primer lugar, se ha relacionado con cambios en las condiciones fisiológicas de la célula (hipoxia, cantidad insuficiente de factores de crecimiento,...) que generan estrés en la misma. Además, también se ha relacionado con la activación de la ruta de p53 por daño al ADN. Otros eventos intracelulares, como la producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), el aumento en la concentración de calcio intracelular y el daño causado a la membrana celular debido a fallos metabólicos también producen la activación de la ruta intrínseca (Campello & Scorrano, 2009). Por último, la activación de la ruta intrínseca puede venir de la señalización que proviene de la ruta extrínseca de la apoptosis a través de la proteína t-Bid. La activación de esta ruta intrínseca se considera un punto de no retorno de la célula, ya que se produce un aumento en la permeabilización de la

membrana mitocondrial, facilitando la liberación de factores proapoptóticos. Esta permeabilidad mitocondrial es producida por heterodimerización de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Cory & Adams, 2002; Ding & Yin, 2009). Si esta ruta es inhibida, se inicia un proceso de muerte celular independiente que asegura la muerte de la célula, el proceso utiliza mecanismos tales como la producción de las ROS, la pérdida de la función mitocondrial y la liberación de proteínas tales como el AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) o la endonucleasa G (Galluzzi et al, 2006). El proceso de activación de la ruta intrínseca de la apoptosis se muestra en la **Figura Nº 5**.

- **Proteínas de la Familia Bcl-2:**

Son un grupo de proteínas que se encargan de regular la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y así mismo favorecer o inhibir la liberación de los factores proapoptóticos como el *citocromo c*, desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. La unión del *citocromo c* junto con APAF-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) genera la formación del complejo apoptosoma, que al unirse a la procaspasa-9, da lugar a la activación de esta proteasa (Ding & Yin, 2009; Pradelli et al, 2010).

Esta familia de proteínas se divide en dos grupos principales dependiendo de su actividad. El grupo de las proteínas proapoptóticas sirven como sensores de señales de muerte y ejecutan su función de permeabilización sobre la mitocondria. Mientras que las proteínas antiapoptóticas inhiben el inicio de la respuesta de muerte por inhibición directa de las proteínas proapoptóticas (Adams & Cory, 2007; Cory & Adams, 2002).

En cuanto a estructura, todos los miembros de esta familia de proteínas comparten una secuencia homóloga en cuatro dominios (BH 1-4). Dependiendo del tipo de actividad pro- o anti-apoptótica, estas proteínas pueden tener o no varios de estos dominios. Si las proteínas presentan los dominios BH1 y BH2, su función molecular es la represión de la apoptosis. Mientras que las moléculas proapoptóticas poseen el dominio BH3 o los dominios BH1 y BH3. Por otra parte, existe un grupo de proteínas que solo presentan el dominio BH3 (*BH3 only proteins*) que presentan actividad proapoptótica y otras proteínas multidominio que son también ejecutoras de la apoptosis (Bax y Bak) (Campo, 2009; Westphal et al). Las características de las proteínas de la familia Bcl-2 se describen en la **Tabla Nº 3**.

	ANTIAPOPTÓTICA	PROAPOPTÓTICA	BH3-ONLY
PROTEÍNA	Bcl-2, Bcl-x _L , Bcl-w, A1 y Mcl-1	Bak, Bax	Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, bNIP3, HRK, Noxa, Puma
DOMINIO presente en la proteína	BH BH1, BH2, BH3 y BH4	BH2 o BH1 y BH3	BH3

Tabla Nº 3: Proteínas de la familia Bcl-2: Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2 según su actividad y presencia de secuencias homólogas clasificadas por dominios BH.

La regulación sobre la activación de las proteínas BH3-only se produce en respuesta a estímulos específicos que dependen del miembro de la familia; su función principal es actuar como sensor primario de estrés celular (Adams & Cory, 2007).

Las proteínas de la familia Bcl-2 pueden ser reguladas a nivel transcripcional o por unión entre ellas mismas, según su función, ya sean pro y antiapoptóticas. En el caso de Bcl-x_L se regula por inducción transcripcional por los factores de crecimiento para promover la supervivencia celular. La regulación de la proteína Mcl-1 se da por degradación vía ubiquitin proteasoma en respuesta a la privación de citoquinas u otros estímulos de muerte (radiación UV). Proteínas como Bax y Bak son reguladas por otras proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Ding & Yin, 2009). La interacción entre los miembros de la familia Bcl-2 es un paso importante para su regulación y mecanismo de acción (Ding & Yin, 2009). La decisión por parte de la célula de morir depende del balance total en la expresión de las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas y proapoptóticas.

Existe una clasificación de las células dependiendo qué tipo de respuesta apoptótica sea más relevante. Las células tipo I, donde la señalización de la caspasa-8 es suficiente para activar la cascada apoptótica general. En las células tipo II, la respuesta apoptótica no es activada exclusivamente por la ruta extrínseca sino que requiere la activación de la ruta intrínseca. La conexión entre estas dos rutas apoptóticas se produce por la activación de la proteína Bid (miembro de la familia proapoptótica Bcl-2) que es fragmentada previamente por la caspasa-8. La forma truncada t-Bid es translocada a la mitocondria y activa la ruta intrínseca de la apoptosis a través de cambios conformacionales sobre las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (Guicciardi & Gores, 2009; Kalthoff et al, 2009) (**Figura Nº 5**).

4.1.3 Caspasas

Son los componentes centrales de la apoptosis, al ser las enzimas que poseen la actividad proteolítica principal. Son proteínas del tipo cisteín-aspartato proteasas (*Cysteininil-aspartate-specific proteases*) y son expresadas como precursores inactivos denominados procaspasas que al ser fragmentadas ejercen su actividad proteolítica (Campo, 2009; Riedl & Scott, 2009). Las caspasas forman un sistema de activación en cascada que es importante en la inducción, transducción y amplificación de la señalización apoptótica intracelular y determina el destino final de la célula, la regulación de la autoinmunidad, la proliferación celular y la diferenciación (McIlwain et al, 2013). Las caspasas se clasifican en dos grandes grupos dependiendo del proceso biológico en el que participan:

En primer lugar se encuentran las **caspasas inflamatorias** (caspasas-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14), que como su nombre indica participan en procesos inflamatorios, específicamente como mediadores de la respuesta inmune innata. En segundo lugar están las **caspasas relacionadas con la apoptosis**, estas caspasas a su vez están subdivididas en dos subgrupos dependiendo del sitio de activación: **las caspasas iniciadoras** (caspasas-8 y -10) que son activadas por oligomerización, y **las caspasas ejecutoras** (caspasas -3, -6 y -7) que son activadas por las caspasas iniciadoras y una vez son activadas fragmentan diferentes sustratos que son los que producen las características morfológicas de la apoptosis (Kaiser et al, 2008; McIlwain et al, 2013) (**Figura N° 4**).

Las caspasas usan un residuo de cisteína como un nucleófilo catalítico y comparten una especificidad para escindir sus sustratos después del residuo aspartato en las proteínas diana. Su acción proteasa es altamente homóloga, generando una subunidad larga de 20 kDa y una subunidad corta de 10 kDa. Por otra parte, las procaspasas constan de un prodominio de 100 aminoácidos en el caso de las caspasas iniciadoras y uno de 30 aminoácidos en el caso de las caspasas ejecutoras. En este prodominio largo se encuentran dos subdominios: DED (*death effector domain*) y CARD (*caspase recruitment domain*). Las caspasas-8 y -10 contienen dos DED en su prodominio, que son los que facilitan la unión de estas caspasas al complejo DISC. En el mismo sentido, las caspasas -2 y -9 contienen solo el dominio CARD. Estos dominios son importantes en la activación de las procaspasas y son los responsables del reclutamiento e iniciación de las caspasas dentro de sus complejos. Luego de la activación, el prodominio es liberado por escisión del enlace Asp-X y la subunidad larga (Campo, 2009; McIlwain et al, 2013; Riedl & Scott, 2009). En la **Figura N° 4** se muestra la estructura y función que presentan las caspasas que participan en el proceso apoptótico.

4.1.4 Regulación de la apoptosis

A nivel de la ruta extrínseca de la apoptosis, la proteína reguladora principal es c-FLIP (*FADD like IL1 β converting enzyme like protease*) que inhibe la unión de la caspasa-8 con FADD, impidiendo así la formación del complejo DISC. Esta proteína comparte una homología estructural con la caspasa-8, pero no tiene el sitio catalítico de la misma (Igney & Krammer, 2002). c-FLIP posee un dominio efector de muerte (DED) en su dominio N-terminal que facilita el reclutamiento al complejo DISC, inhibiendo la activación del mismo (Campo, 2009).

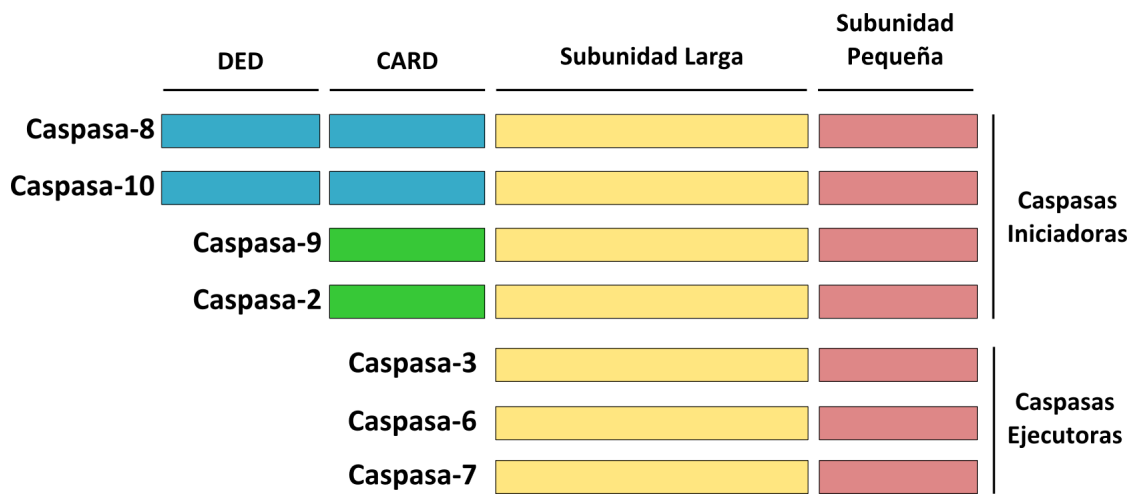


Figura Nº 4: Clasificación y estructura de las caspasas: En esta figura se muestran las diferentes subunidades de estas proteasas y la función que tienen en el proceso apoptótico (McIlwain et al, 2013).

En la ruta extrínseca de la apoptosis, aparte de la regulación por parte de las proteínas de la familia Bcl-2, se encuentran las proteínas de inhibición de la apoptosis (IAPs) que son importantes en la regulación de la actividad proteasa de las caspasas. Son las encargadas de ubiquitinar a las caspasas y por tanto facilitan su degradación por la vía del proteasoma. De la misma manera, las IAPs son inhibidas por proteínas que son liberadas durante la permeabilización de la membrana mitocondrial, estas proteínas son, *Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases)* /*DIABLO (Direct IAP-Binding protein with Low PI)* y *OMI/HtrA2 (High temperature requirement protein A2)* (LaCasse et al, 2009). Las IAPs son un grupo de proteínas altamente conservadas y con diferentes patrones de expresión en varios tejidos. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran: *NAIP (Neuronal apoptosis inhibitory protein)*, *c-IAP I y 2/HIAP-1 y 2*, *XIAP/Hilp (X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein)*, *Survivin* y *Bruce*. A nivel mitocondrial, la activación de las caspasas es regulada por *XIAP*, *c-IAP 1 y 2*, las cuales actúan directamente sobre la procaspasa-9, previniendo su procesamiento y activación inducida por el citocromo c. Se ha encontrado que un aumento de la

expresión de las IAPs inhibe la apoptosis inducida por Bax y otros factores proapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 (Ghibelli & Diederich, 2010).

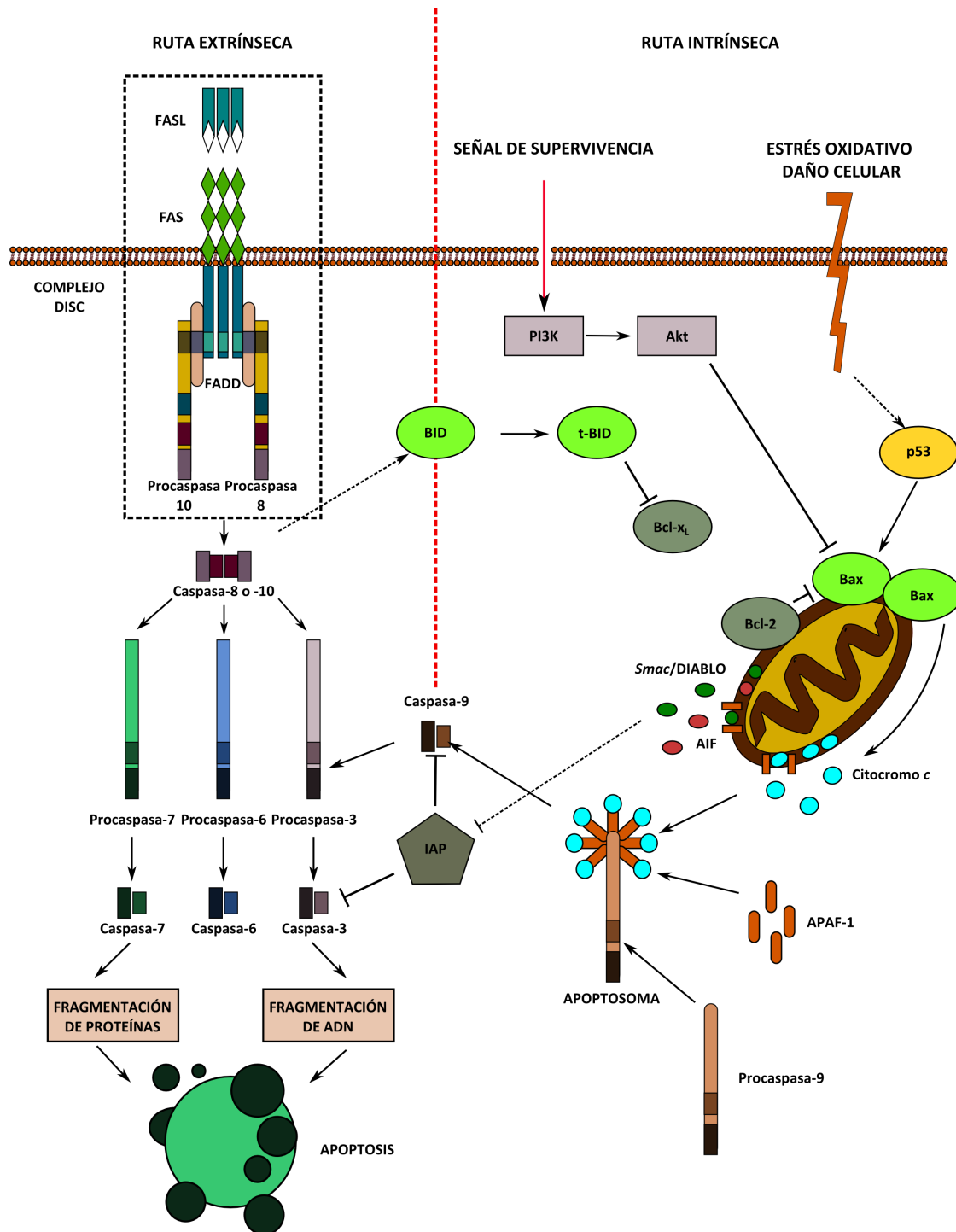


Figura N° 5: Rutas de señalización de la apoptosis: Existen dos rutas de señalización de la apoptosis. En primer lugar está la *ruta extrínseca* activada por la unión de receptor-ligando de muerte y la consecuente formación del complejo DISC; este complejo favorece la fragmentación y activación de las caspasas iniciadoras (-8 y -10), seguido de la activación de las caspasas efectoras (-3 y -7) que amplificarán el proceso proteolítico. Por otra parte, se encuentra la *ruta intrínseca* que se inicia por acción de factores internos como el daño celular o estrés oxidativo, generando una disminución del potencial de membrana mitocondrial, que culmina con la liberación del *citocromo c* formación del apoptosoma, que conlleva a la activación de la caspasa-9 y posteriormente la activación de las caspasas efectoras.

4.2 PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN DE SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN CELULAR:

El control de los procesos moleculares implicados en la proliferación y supervivencia celular son importantes para mantener la homeostasis de los tejidos. Se ha descrito que las rutas de señalización principales en estos dos procesos son las rutas de señalización de PI3K/Akt y la ruta de las MAPKs. Cuando estas rutas son desreguladas dan lugar a procesos patológicos como el cáncer, en donde la sobreexpresión de estas rutas genera un crecimiento descontrolado de las células o permite la evasión de las señales de muerte de las mismas.

4.2.1. Ruta de señalización PI3K/Akt

Fisiológicamente, la ruta de señalización PI3K/Akt es importante en procesos de crecimiento celular, supervivencia y metabolismo (Bukowski et al, 2009). La activación de esta ruta de señalización se da principalmente por estímulos generados tras la activación de receptores que responden a factores de crecimiento (receptores tirosina quinasa, tales como EGFR, IGFR, etc.) y receptores acoplados a proteínas G. La activación intracelular de la ruta comienza gracias a la unión de la subunidad p85 de la proteína PI3K (*phosphatidyl inositol 3 kinase*) con la región intracelular del receptor, esta unión favorece la activación de PI3K permitiendo su reclutamiento en la membrana (Bukowski et al, 2009; Liu et al, 2009; Rommel et al, 2011b). La ruta de señalización de PI3K/Akt se describe en la **Figura Nº 6**.

- **PI3K (*phosphatidyl inositol 3 kinase*):**

La función principal de la proteína PI3K es la fosforilación de la posición 3'-OH de los inositol fosfolípidos de la membrana celular para generar fosfoinosítidos, especialmente lleva a cabo la fosforilación de PIP₂ (fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato) a PIP₃ (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). La función principal de los fosfoinosítidos es actuar como segundos mensajeros en la activación "downstream" de rutas que regulan procesos de crecimiento celular, supervivencia y procesos metabólicos. PIP₃ se une a un grupo de proteínas con dominio de homología *pleckstrin* (PH) y proteínas que interaccionan con lípidos presentes en la membrana plasmática para ser reclutadas. Esta quinasa está dividida en tres tipos, de acuerdo a sus características estructurales y la especificidad de su sustrato: Estas son PI3K de clase IA y clase IB, PI3K de clase II y PI3K de clase III (Engelman et al, 2006; Katso et al, 2001).

- **Proteína quinasa Akt:**

Es una proteína con dominio serina/treonina quinasa con dominio PH que se enlaza a fosfoinosítidos en la membrana celular. Existen tres isoformas de esta quinasa: Akt 1 (PKB α), Akt 2 (PKB β) y Akt 3 (PKB γ). Akt 1 y 2 se expresan de forma ubicua, mientras que Akt 3 está expresada principalmente en tejido neuronal. Estas tres isoformas son codificadas por los genes PKB α , PKB β y PKB γ , respectivamente (Franke et al, 2003; Liu et al, 2009; Rommel et al). Las tres isoformas son similares estructuralmente, constan de un dominio amino-terminal de homología *pleckstrin*, un dominio catalítico serina-treonina quinasa en α -helice, y un dominio pequeño carboxi-terminal regulador. El dominio PH se enlaza a los productos fosfatidilinositol de la PI3K de manera equitativa tanto a PIP₂ como a PIP₃, sin embargo, tiene mayor afinidad por PIP₂. Este dominio *pleckstrin* es similar al de otras serina-treonina quinasas tales como PKA, PKC, RSK, p70.

La activación de Akt se inicia con su translocación a la membrana plasmática, la cual es mediada por acoplamiento del dominio *pleckstrin* de Akt al PIP₃ situado en la membrana. Esta unión, genera un cambio conformacional en la proteína, que permite la exposición de dos residuos aminoácidos para ser fosforilados, estos residuos son: treonina 308 (Thr308) que es fosforilado por PDK1 en la membrana celular, y en serina 473 (Ser473), fosforilado por el complejo mTORC2 (Liu et al, 2009). La unión entre PDK1 y Akt se produce mediante la unión de su dominio *pleckstrin* a la membrana y la posterior interacción entre estas dos proteínas produciendo la fosforilación de Akt. Posteriormente, se da un cambio en la conformación de la proteína tras la fosforilación en el residuo Ser473 por parte de complejo mTORC2, generando una serie de interacciones intramoleculares entre el motivo hidrofóbico y su estructura aceptora en el dominio catalítico (Rommel et al, 2011a). Para la activación completa de Akt es necesaria la fosforilación de estos dos aminoácidos. Una vez Akt es activada, esta proteína fosforila otras proteínas “*downstream*” implicadas en procesos de supervivencia celular (Meuillet, 2011) **(Figura N° 6).**

Existen múltiples mecanismos de regulación de Akt, ya sea por inhibición de las proteínas que se encuentran “*upstream*” de la ruta, como la inhibición de la actividad quinasa de la proteína en sí. La inhibición de Akt por señalización “*upstream*” es producida principalmente por la fosfatasa lipídica PTEN (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate-3-phosphatase*). Esta fosfatasa convierte los fosfoinosítidos fosforilados en 3ª su forma no fosforilada. Además está la proteína SHIP (*Src homology-2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase*) que hidroliza PIP₃ a PIP₂, regulando negativamente a Akt, ya que no

tiene sitio de unión a la membrana. La función de PTEN o SHIP depende directamente de la célula y del tejido específico (Bunney & Katan, 2010; Carnero et al, 2008). El otro tipo de regulación, es llevado a cabo por las fosfatasa específicas de Akt, donde la eliminación de alguno de los grupos fosfato de Akt, lleva directamente a la inactivación de la proteína. Existen dos fosfatasa que actúan directamente sobre Akt: *PP2A (protein phosphatase 2 A)*. Por otra parte, se ha descrito en células mamíferas, que la proteína B56 β regula la fosforilación de la Thr308 (Choi et al, 2010). Otra de las proteínas que defosforilan a Akt, son aquellas que actúan sobre su dominio hidrofóbico: la fosfatasa PLHPP1 y 2 (*Leucine-rich repeat protein phosphatase*) se encarga de defosforilar a Akt en el residuo Ser473 (Franke et al, 2003).

Las proteínas sustrato de Akt tienen como función principal el mantenimiento de la supervivencia y la proliferación celular, además de la inhibición de varias proteínas implicadas en la muerte celular. Bioquímicamente, se caracterizan por tener un sitio de fosforilación del tipo RXRXXS/T-B, donde X=aminoácido y B=residuo hidrofóbico voluminoso (Manning & Cantley, 2007). En la **Tabla Nº 4**, se muestran las principales proteínas sustrato de esta quinasa.

SUSTRATO	SITIO DE FOSFORILACIÓN	FUNCIÓN
GSK3 α	Ser21	Inhibir la actividad de la quinasa GSK.
ASK1	Ser83	Prevenir la apoptosis
Bad	Ser136	Prevenir la apoptosis
Caspasa-9	Ser 196	Prevenir actividad proteasa
Complejo mTORC1-Raptor	Ser 2448	Activar actividad de mTORC1
c-Raf	Ser259	Inactivar la ruta de Raf-MAPK
b-Raf	Ser259	Inactivar la ruta Raf-MAPK

Tabla Nº 4: Principales proteínas sustrato de p-Akt: Cada una de estas proteínas están implicadas en procesos de proliferación y supervivencia celular (Engelman et al, 2006; Rommel et al, 2011c).

4.2.2 Papel de la ruta de señalización PI3KAakt en cáncer

Existen dos mecanismos por los que la ruta de señalización PI3K/Akt puede adquirir carácter oncogénico: la activación constitutiva de los receptores tirosina quinasa y algunas mutaciones somáticas de componentes específicos de la ruta de señalización (Engelman, 2009). A nivel de los receptores tirosina quinasa, se ha encontrado que presentan una activación aberrante en la mayoría de tumores sólidos, esta activación oncogénica se puede producir por una expresión excesiva del ligando, mutaciones en la activación o transactivación a través de la dimerización entre diferentes tipos de receptores tirosina quinasa (Vlahovic &

Crawford, 2003). De la misma manera, se han señalado varias alteraciones genéticas en la célula tumoral que llevan a la activación descontrolada de esta ruta de señalización: En primer lugar está la pérdida de la actividad del supresor de tumores PTEN por mutaciones del gen que codifica para esta proteína (Hennessy et al, 2005), esta pérdida puede ser llevada cabo por la codificación de una fosfatasa que inhibe la formación de 3'-fosfatidil inositol 3,4,5 di-fosfato (PIP₃), impidiendo la fosforilación de Akt (Liu et al, 2009). En segundo lugar, se han descrito modificaciones en la subunidad catalítica p110α de la PI3K clase IA, esta modificación se debe a mutaciones del gen PI3KCA, produciendo así un aumento en la actividad quinasa, manteniendo en crecimiento las células en condiciones de privación de factores de crecimiento, produciendo la transformación de las células (Bunney & Katan, 2010; Hennessy et al, 2005). Por último, se encuentran las alteraciones genéticas en las tres isoformas de la proteína Akt. Para Akt 1 se han observado mutaciones en el gen E17K, generándose un dominio de homología *pleckstrin* diferente, que altera la selectividad de unión de Akt a la membrana plasmática, teniendo la capacidad de unirse a sitios carentes de fosfoinosítidos fosforilados en 3'. Esta mutación produce una fosforilación constitutiva de Akt en Ser 473 en ausencia de suero (Carnero et al, 2008; Manning & Cantley, 2007).

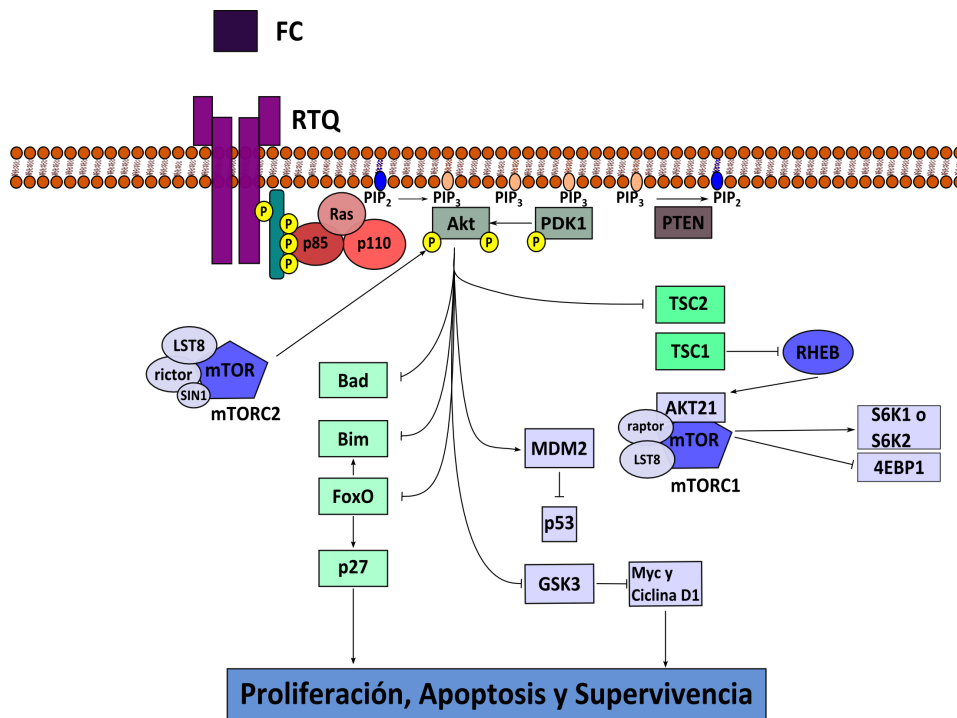


Figura N° 6: Ruta de señalización de PI3k/Akt: La activación del receptor tirosina quinasa (RTQ) por unión de los diferentes factores de crecimiento (FC), favorece la activación de la quinasa PI3K. Esta activación lleva a la fosforilación de PIP₂ en la membrana a PIP₃. La producción de PIP₃ lleva al reclutamiento de otras quinasas con dominio *pleckstrin* tales como Akt y PDK1. Este reclutamiento, lleva a la activación de Akt y en consecuencia la activación e inhibición de proteínas "downstream" propagando la señalización. La activación o inhibición de estas proteínas favorecen la supervivencia celular e inhiben la señalización apoptótica. (Engelman et al, 2006).

4.2.3 Ruta de señalización de las MAPKs (mitogen activated protein kinases)

La ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) está compuesta por una familia de serina/treonina quinasas. Se encuentra altamente conservada desde organismos unicelulares hasta multicelulares, incluyendo los mamíferos. Su función principal es la transducción de señales extracelulares producidas por los factores de crecimiento y citoquinas (entre los que se encuentran el EGF, VEG, insulina, neurotrofinas, citoquinas proinflamatorias) y señales extracelulares capaces de generar estrés en la célula (radiación UV, choque térmico, fármacos, estrés oxidativo, entre otros). Todas estas señales son transducidas para activar diferentes rutas intracelulares relacionadas con la proliferación celular o activación de respuestas ante estrés celular y apoptosis, dependiendo del tipo de estímulo (Klussmann et al, 2008; Runchel et al, 2010).

En mamíferos, existen tres subfamilias de MAPKs, entre las que se encuentran las quinasas reguladas por señales extracelulares Erk (*extracellular signal-regulated kinases*), las quinasas c-Jun amino terminales JNKs (*c-Jun amino terminal kinases*), las isoformas de p38 (p38s), Erk 5 y Erk 3. Todas estas quinasas tienen como función directa la fosforilación y activación de dianas nucleares y citosólicas. Las MAPKs controlan igualmente eventos moleculares, como la reorganización de citoesqueleto y la reorganización génica (Klussmann et al, 2008).

Las MAPKs están reguladas “*upstream*” por las quinasas MAPKK (MKKs) y por las fosfatasa MPK que modifican la fosforilación de las MAPKs de los residuos en treonina o tirosina o ambos (Boutros et al, 2008). Las MAPKs activadas catalizan la fosforilación sobre residuos serina y treonina de sustratos concretos y regulan un amplio rango de respuestas celulares, tales como proliferación, diferenciación, y apoptosis. A nivel fisiológico, estas proteínas están involucradas en la regulación del desarrollo embrionario y el mantenimiento de la homeostasis tisular. Por otra parte, existen señales extracelulares que pueden inducir la activación de estas proteínas en condiciones patológicas, como el cáncer (Huang et al, 2010).

- **MEK/Erk (*extracellular signal-regulated kinases*)**

Las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 /2 (Erk 1/2) son isoformas homólogas, que se expresan en casi todos los tejidos. Estas dos isoformas comparten un 83% de su secuencia proteica, son reguladas por señales moleculares similares y sus funciones se superponen en muchos aspectos.

La cascada MEK/Erk es activada en respuesta a receptores tirosina quinasa (Pearson et al, 2001). Los factores de crecimiento inducen sobre el receptor su

dimerización y fosforilación por actividades tirosina quinasas intrínsecas. La fosforilación en tirosina induce el reclutamiento de proteínas con dominio SH2 (*Src homology 2*), entre las que se encuentran la proteína Grb2. Grb2 está unido de manera constitutiva al activador de Ras-Sos, que se encuentra localizado en el citosol. La relocalización activa Sos, el cual activa a su vez a Ras. Ras es una GTPasa que hidroliza al guanósil trifosfato a guanina difosfato. Una vez que Ras es capaz de unirse a GTP puede activar muchos efectores “downstream”, continuando la propagación y amplificación de la señalización. La célula debe tener un control especial en el estado de Ras GTP/GDP. Existen dos clases de proteínas que ejercen este control, las proteínas con actividad GTPasa (GAPs) que inactivan a Ras, estimulando su actividad intrínseca de hidrólisis de GTP a GDP. Por otra parte, están los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que promueven el intercambio de GDP a GTP, aumentando la cantidad de Ras unido a GTP, aumentando así la actividad de Ras. El equilibrio entre actividad de ambos grupos de proteínas, GEFs y GAPs, determinara el nivel de activación de Ras. Existen tres isoformas de Ras, H-Ras, K-Ras y N-Ras (Mor & Philips, 2006).

Cuando el GTP se une a Ras, esta proteína recluta en la membrana a Raf, activándola por fosforilación ya que facilita su unión en la membrana plasmática. Raf cataliza la fosforilación y activación de las MAPKs de Erk 1 / 2 (MEK 1 y MEK 2). Una vez MEK está activado, activan a las quinasas Erk 1 y 2. Cuando estas proteínas son activadas, se dimerizan, una parte se transloca al núcleo donde fosforilan diferentes factores de transcripción (por ejemplo los factores de transcripción de la familia ets), y otra parte permanece en el citosol, donde catalizan la fosforilación de sustratos en diferentes compartimentos celulares (Klussmann et al, 2008; Roux & Blenis, 2004). La cascada de señalización de MAPK/Erk se muestra en la **Figura Nº 7**.

- **JNKs (*c-Jun amino terminal kinases*)**

Las JNKs constan al menos de diez isoformas derivadas del splicing alternativo de tres genes: JNK1, JNK2, JNK3. JNK1 y 2 están expresados ubicuamente, mientras que JNK 3 se encuentra principalmente en cerebro (Wagner & Nebreda, 2009). Las quinasas “upstream” que fosforilan a JNK son MKK4 y MKK7 en residuos de treonina y tirosina respectivamente. Para la activación completa de JNK se requieren estas dos quinasas. MKK4 y MKK7 son fosforiladas y activadas a su vez por un amplio número de quinasas “upstream”, estas quinasas pertenecen al grupo de las MAP3Ks (MEKK1, MEKK2, MLK1, MLK2 y MLK4). Las JNK están implicadas en la proliferación celular y la apoptosis a través de la fosforilación de varias dianas. Dentro de estas se encuentran el factores de transcripción AP-1, que incluyen a los miembros de la familia c-Jun y Fos (Bogoyevitch et al, 2010).

Hay controversia acerca del papel de las JNKs a nivel celular, se ha descrito que puede cumplir un papel tanto antiapoptótico como proapoptótico. Sin embargo, a pesar de las evidencias, no se ha llegado a una conclusión definitiva acerca de la función de esta proteína, solo se conoce que el tipo de respuesta depende principalmente del tipo de célula y del tipo de estímulo recibido. La activación de JNK es un proceso altamente regulado, el tiempo y el mecanismo de la activación de JNK depende de la cantidad de estrés que tiene la célula, siendo un indicador importante de la homeostasis celular (Dhanasekaran & Reddy, 2008; Weston & Davis, 2007). El proceso de activación de JNK se muestra en la **Figura Nº 7**.

Por otra parte se ha relacionado a JNK en situaciones de estrés mitocondrial, e igualmente este proceso puede ser el inicio de la muerte celular. El retículo endoplasmático al estar en situación de estrés libera calcio. El calcio está implicado en la activación de JNK, provocando la liberación de calcio desde el retículo al citosol para dirigirse a la mitocondria, lo que permite luego una redistribución dinámica de las proteínas Bax/Bak en la membrana mitocondrial. Bax se dimeriza para llevar a la formación del poro en la membrana mitocondrial, que facilita la liberación del citocromo c.

- **p38s:**

Existen cuatro isoformas de p38 en mamíferos: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . La isoformas α y β están ampliamente expresadas en la mayoría de los tejidos. Mientras que las isoformas γ y δ se expresan estrictamente en células de músculo, piel y riñones. p38 α es una serina treonina quinasa que responde a señales de estrés tales como liposacárido endotóxico (LPS) y shock térmico. p38 α puede ser activada por un mecanismo independiente de MAPKs mediado por TAB1 (*TGF- β - activated kinase 1*). Las proteínas diana de p38 α incluyen a las quinasas MK2 y MK5 (PRAK) y los factores de transcripción tales como ATF2 y Mitf. Aparte de su papel en señales de estrés, p38 tiene un papel importante en la transición del ciclo celular y diferenciación celular. La ruta de activación de p38 se muestra en la **Figura Nº 7**.

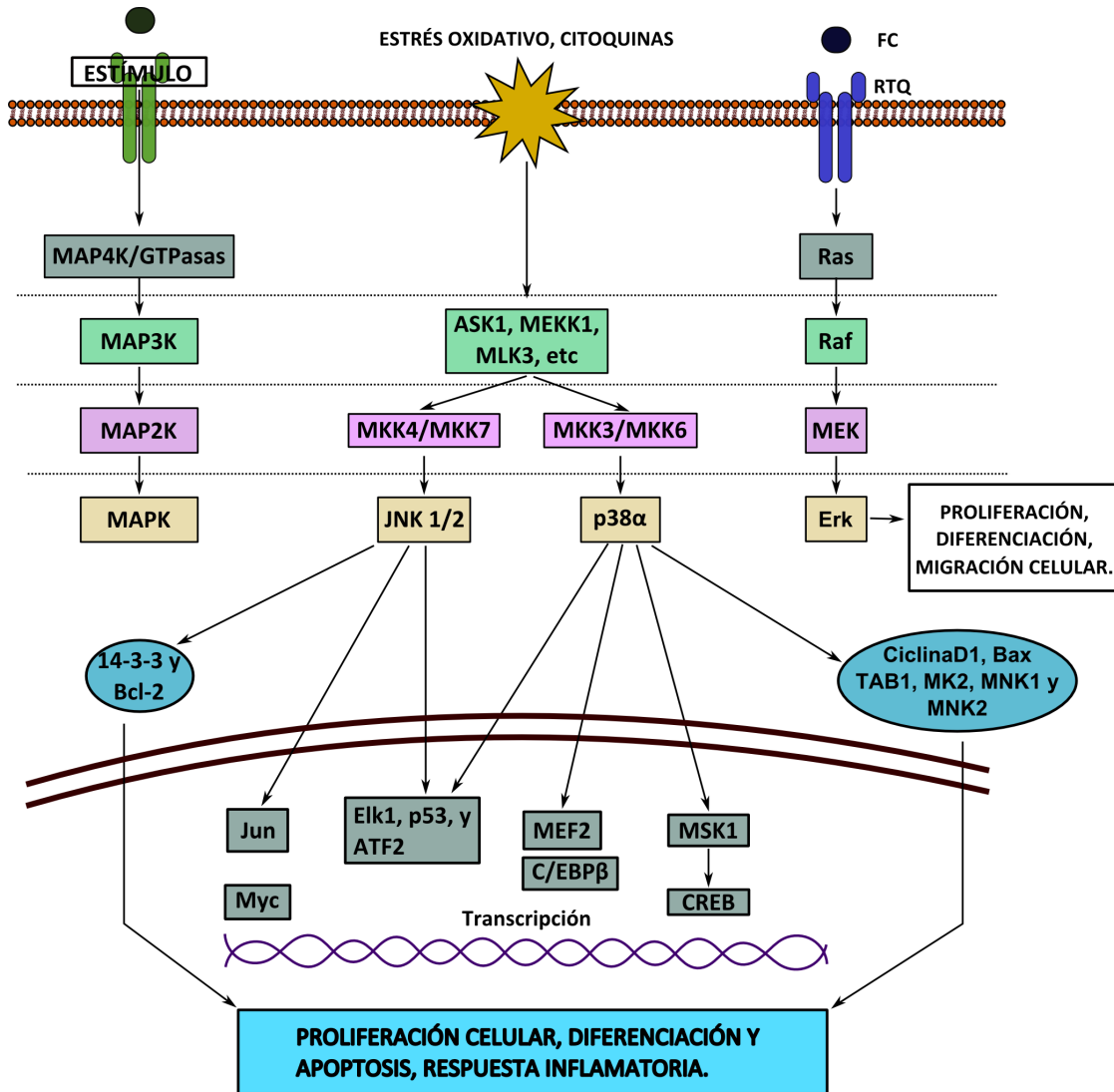


Figura Nº 7: Cascadas de señalización de MAPKs: Estas cascadas de señalización son activadas a causa de diferentes estímulos. La ruta de señalización MEK/Erk responde a estímulos que provienen de receptores tirosina quinasa que han sido estimulados por su respectivo factor de crecimiento y cuya respuesta principal es la proliferación. Por otra parte la recepción de señales de estrés oxidativo y citoquinas activa la cascada que finaliza con la fosforilación de JNK que dependiendo de la intensidad y persistencia del estímulo puede terminar en proliferación o apoptosis (Kim & Choi, 2010; Wagner & Nebreda, 2009).

5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN POR ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN SUPERVIVENCIA Y MUERTE CELULAR

El retículo endoplasmático juega un papel importante en la homeostasis de la célula gracias a su función en el procesamiento, plegamiento y modificación de las cadenas de polipéptidos nacies de manera que las proteínas modificadas apropiadamente puedan ser transportadas al aparato de Golgi (Harr & Distelhorst, 2009). Existen gran variedad de enzimas y chaperonas que necesitan cambios en procesos de oxidación-reducción y aumento del calcio en lumen del retículo endoplasmático, tal es el caso de las glucosilaciones, la formación de puentes disulfuro y la modificación de aminoácidos. Por otra parte, el retículo es el almacén por excelencia del calcio intracelular relacionado con la homeostasis celular y el calcio que media la señalización celular (Harr & Distelhorst, 2009; Verfaillie et al, 2012).

Cuando la homeostasis del retículo se ve comprometida, debido a la acumulación de proteínas desplegadas en el lumen por causa de un desbalance entre la carga de plegamiento, el direccionamiento de las proteínas, los cambios en el estatus redox en la célula, la pérdida de la homeostasis del calcio y la privación de glucosa, pueden llevar al denominado estrés de retículo endoplasmático (ERE) (Harr & Distelhorst, 2009; Malhotra & Kaufman, 2007).

Existen dos formas de respuesta por parte de la célula ante este tipo de estrés. En primer lugar, se activa la denominada **respuesta a proteínas mal plegadas** (*unfolded protein response, UPR*) que favorece la supervivencia celular, aumentando así la transcripción de genes que sintetizan chaperonas y enzimas (ubiquitin-ligasas) que facilitan el proceso de plegamiento, así como la degradación o inhibición de la síntesis de las proteínas acumuladas en el retículo (Schröder & Kaufman, 2005). Sin embargo, cuando este primer proceso no es suficiente y el estrés es persistente e irreversible, lo que se produce es la activación de la autofagia o apoptosis dependiendo del caso y del tipo de estímulo (Harr & Distelhorst, 2009; Healy et al, 2009; Shore et al, 2010).

5.1 RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR)

Existen tres rutas de señalización involucradas en la UPR, cada una de estas rutas activa diferentes factores de transcripción relacionados con esta respuesta ante el estrés. Estos factores a su vez, transcriben genes que codifican chaperonas que son expresadas en el lumen del RE para facilitar el plegamiento de las proteínas acumuladas. La chaperona más

importante en este proceso es GRP78 (también conocida como proteína de unión a inmunoglobulina, BiP). En estado normal, esta proteína se encuentra ensamblada a proteínas transmembrana del retículo, y la disociación de esta interacción activa cada una de las rutas de la UPR (Ni et al, 2011) **(Figura N° 8)**.

La activación inicial de la UPR parece ser mediada por la IRE-1 (*inositol required protein-1*), proteína que actúa como sensor de estrés en la membrana del retículo. Esta proteína es una quinasa transmembrana que se autofosforila en su dominio C-terminal del interior de la membrana del retículo. Una vez activada, esta proteína activa su actividad RNAsa fragmentando el intrón de 26 pares de bases del mRNA que codifica la proteína XBP-1 (*X-box binding protein-1*). Durante el estrés de retículo, la transcripción del XBP-1 truncado activa los genes de respuesta de RE (*Dna J*, *p58*, *ERdj4*, *EDEM*, y *PDI*) para estimular el plegamiento de proteínas, el control de calidad de las mismas y la degradación; también activa genes relacionados con la homeostasis redox y el estrés oxidativo, protegiendo a la célula del mismo. Se ha encontrado que la fragmentación de XBP-1 se produce al inicio de la respuesta de estrés y se inhibe cuando esta respuesta es persistente en paralelo a la activación de la muerte celular, lo que sugiere que la señalización por IRE-1 permite parcialmente la supervivencia celular (Harr & Distelhorst, 2009; Luo & Lee, 2012) **(Figura N° 8)**.

La segunda proteína que puede activar la UPR es ATF-6 (*activating transcription factor-6*). Al igual que IRE-1, está anclado a la membrana del retículo y unida a GRP78 en el lumen de RE en condiciones normales. El estrés de retículo hace que ATF-6 se disocie, siendo capaz de translocarse al aparato de Golgi, siendo sustrato de dos proteasas S1P y S2P. La proteína ATF-6 ya procesada se transloca al núcleo para activar transcripcionalmente genes relacionados con RE. ATF-6 es un factor de transcripción positivo para GRP78 y XBP-1 amplificando la UPR y creando una potenciación de las rutas. Un gen importante en respuesta a ATF-6 es CHOP (también conocido como GADD153), un factor de transcripción inducido por daño al ADN. La activación transcripcional de CHOP está implicada en apoptosis inducida por estrés de retículo (Harr & Distelhorst, 2009; Tabas & Ron, 2011) **(Figura N° 8)**.

Otra de las proteínas implicadas en la UPR es la quinasa PERK (*PKR like ER kinase*), ésta proteína se autofosforila por estrés en el RE. La proteína BiP/GRP78 se libera de la unión con PERK y los monómeros de esta proteína se homodimerizan a través de su dominio luminal, favoreciendo la fosforilación. Cuando se activa, sufre un cambio conformacional que aumenta su afinidad por su sustrato "downstream", el eIF2 α (*eukariotic translation initiation factor 2 α*), fosforilándolo. Esta activación tiene como función la inhibición de la síntesis de proteínas, a través de la inhibición del ensamblaje del ribosoma 80S, que tiene como consecuencia la inhibición de la traducción de la ciclinaD1, lo que produce un arresto del ciclo celular (Luo & Lee). De la misma manera, la fosforilación de eIF2 α acelera la UPR por

la traducción inducida específicamente del factor de transcripción CREB, activando el factor de transcripción 4 (ATF-4). La activación de ATF-4 contribuye a la supervivencia por protección celular ante el estrés oxidativo y la privación de nutrientes (Rouschop et al; Verfaillie et al, 2012) (**Figura Nº 8**).

5.2 CHAPERONAS INVOLUCRADAS EN ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Como se ha descrito anteriormente, bajo condiciones de estrés, las moléculas de señalización IRE-1, ATF-6 y PERK son necesarias para la transcripción de las chaperonas de retículo para aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas del mismo (GRP78 por ejemplo). Una de las moléculas importantes en la mediación de la UPR son la calnexina y la calreticulina, que son proteínas de unión a calcio responsables del correcto plegamiento de proteínas glicosiladas y su posterior transporte al aparato de Golgi (Breckenridge et al, 2003a). Durante el estrés de retículo, cuando las proteínas han sufrido un plegamiento o glicosilación inapropiada, son mantenidas en el ciclo de la calnexina antes de ser transportadas fuera del retículo o sujetas a la degradación proteica por un proceso llamado degradación asociada al RE (*ERAD*). ERAD es el mecanismo por el cual las proteínas degradadas o desplegadas son poliubiquitinadas y dirigidas a su degradación por proteasoma.

5.3 FUNCIÓN DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN APOPTOSIS

Cuando el estrés del retículo endoplasmático es persistente, la célula afectada muere por apoptosis. Todos los componentes de la UPR inducen apoptosis por activación de factor de transcripción CHOP (GADD153), que reprime la transcripción de la proteína antiapoptótica Bcl-2. De la misma manera CHOP activa transcripcionalmente a GADD134 y ERO1 α que aumentan la síntesis proteica y la oxidación de las proteínas de retículo, respectivamente (McCullough et al, 2001). Por otra parte IRE-1 puede inducir apoptosis por una ruta de transducción de señales que es independiente de la escisión de XBP-1. La activación de IRE-1 recluta al factor TRAF-2 (*TNF-receptor associated factor 2*), y la asociación de estas moléculas activan la señalización de JNK. Una vez se unen IRE-1 y TRAF-2, se da la activación de la proteína ASK-1 en respuesta al estrés de retículo, este evento es importante para la activación de la señalización mediada por JNK (Verma & Datta). De la misma manera, se ha encontrado que en el complejo de IRE-1 y TRAF-2 está asociada la caspasa-12 (murina) o la caspasa-4 (humanos). Esta caspasa es una proteína localizada en el RE que contiene un dominio de reclutamiento por activación de caspasas (CARD), que es activado en las células por inducción de estrés de retículo. La caspasa-12 activa la caspasa-9, mostrando la activación de esta proteasa de manera independiente a la liberación de citocromo c. Además,

la caspasa-12 es activada cuando hay liberación de calcio del retículo por estrés (Breckenridge et al, 2003a; Verfaillie et al, 2012) **(Figura Nº 9)**.

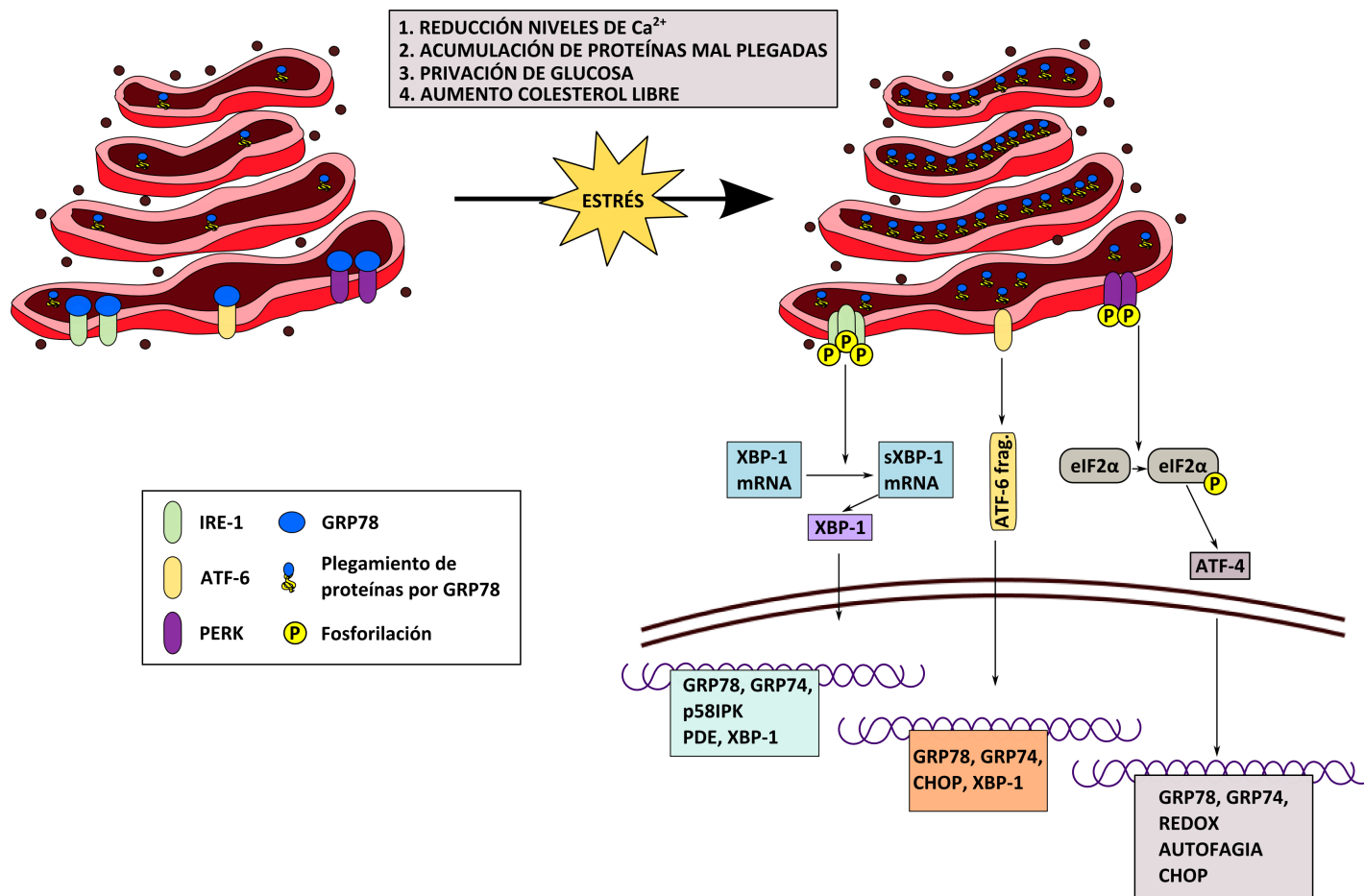


Figura Nº 8 : Estrés de retículo endoplasmático y respuesta a proteínas mal plegadas: La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo a causa de múltiples eventos que alteran la homeostasis de este orgánulo (reducción en los niveles de calcio, privación de nutrientes, entre otros), activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La activación de esta ruta implica la disociación de la chaperona GRP78 de los sensores de estrés que se encuentran en la membrana del retículo (IRE-1, PERK y ATF-6). Estos sensores de estrés activan factores de transcripción implicados en la inhibición en la síntesis de proteínas y se incrementa la síntesis de chaperonas que disminuyen la carga de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo (Breckenridge et al, 2003a; Verfaillie et al, 2012).

5.3.1 Relación del estrés del retículo endoplasmático con la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis:

Se ha descrito una estrecha relación entre el RE y la mitocondria, generando un intercambio de lípidos y calcio en sitios especializados denominados membranas asociadas a mitocondria. Este intercambio tiene una función importante en la regulación de la muerte celular que sigue al estrés de retículo (Filadi et al, 2012; Rodriguez et al, 2011).

Cuando se hace referencia a las proteínas de la familia Bcl-2, se ha encontrado que proteínas como Bax, Bak y Bcl-2 están asociadas a la membrana del retículo endoplasmático tanto en condiciones basales como en las diferentes formas de estrés. Esta asociación está implicada en la regulación del contenido de calcio y por tanto en la cantidad de calcio que debe ser liberada durante la estimulación agonista. Una sobrecarga de calcio intracelular puede ser citotóxica e iniciar la apoptosis como consecuencia de la apertura del poro de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo *c* y la activación de diferentes fosfatasas y proteasas, como la calcineurina (Filadi et al, 2012; Henry-Mowatt et al, 2004) **(Figura Nº 9)**.

Cuando proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L son sobreexpresadas en el RE hay una reducción en la concentración de calcio libre protegiendo así a la célula de la apoptosis. Otro mecanismo de protección está relacionado con la desestabilización e inactivación de la proteína que importa calcio al retículo SERCA (*sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase*) por acción de Bcl-2 (Harr & Distelhorst, 2009). De la misma manera, se ha descrito que Bcl-2 y Bcl-x_L muestran actividad antiapoptótica previniendo la redistribución y la recepción por parte de la mitocondria del calcio citoplasmático, mientras que la sobreexpresión de Mcl1 disminuye los niveles de calcio mitocondrial sin afectar los niveles de calcio luminal del retículo, protegiendo a la célula de la apoptosis (Verfaillie et al, 2012) **(Figura Nº 9)**.

Por otra parte, las proteínas proapoptóticas Bax y Bak están presentes también en el RE favoreciendo la liberación de calcio de retículo en el caso que los niveles de calcio en el RE estén elevados, lo que implica una mayor sensibilidad a la activación de la apoptosis. Por otra parte, se ha descrito que la proteína Bax es capaz de oligomerizar en el retículo igual que lo hace en la mitocondria, aumentando la permeabilización de la membrana permitiendo la salida de proteínas como GRP78 (Ghibelli & Diederich, 2010; Westphal et al, 2011) **(Figura Nº 9)**. Otra función importante de las proteínas de la familia Bcl-2 en el RE es la

transmisión de señales apoptóticas desde el RE a la mitocondria. Estas proteínas pueden reclutar la caspasa-8 al retículo, la cual una vez activada escinde un fragmento de 20 kDa de la proteína Bap 31 (*Bcl-2 associated protein 31*), una proteína integral de la membrana del retículo. Este fragmento de 20 kDa se dirige a la mitocondria e inicia la fisión mitocondrial dependiente de calcio, la apertura del canal mitocondrial y la liberación del citocromo c (Breckenridge et al, 2003b; Iwasawa et al; Verfaillie et al, 2012) **(Figura Nº 9)**.

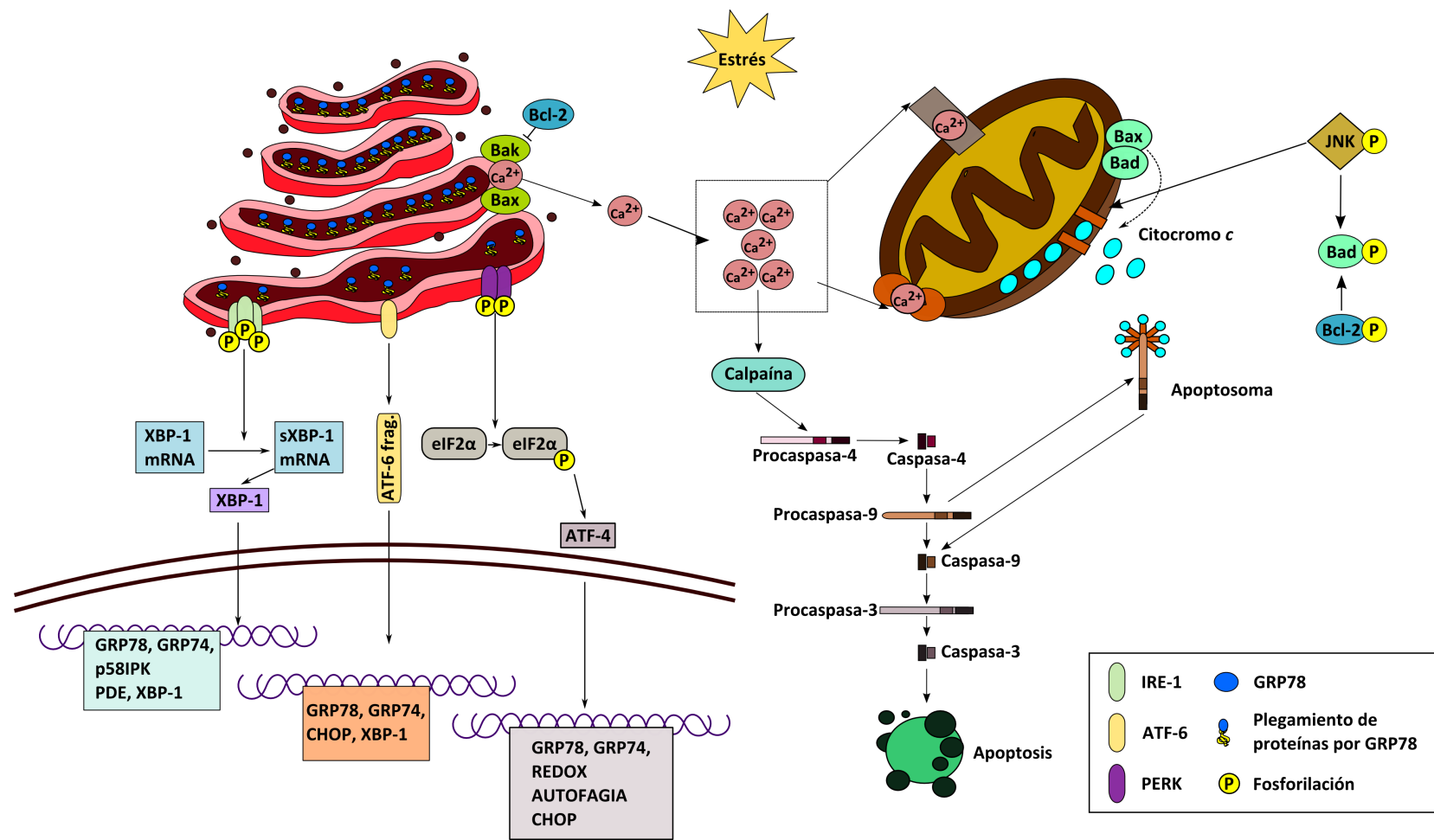


Figura Nº 9: Participación del estrés de retículo endoplasmático en la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis: Inicialmente se produce la acumulación de las proteínas mal plegadas en el lumen del retículo generando la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), si este estrés es persistente se genera el llamado estrés de RE favoreciendo la liberación del calcio desde el lumen del RE hacia el citosol por aumento en la permeabilidad de la membrana del retículo generado por un complejo de las proteínas de la familia Bcl-2 (Bax-Bak), el calcio liberado es internalizado por la mitocondria favoreciendo la activación de la respuesta apoptótica vía mitocondria (Filadi et al, 2012; Shore et al, 2010).

6. MICRODOMINIOS LIPÍDICOS DE MEMBRANA “RAFTS”

En los últimos años, el modelo del mosaico fluido de la membrana celular ha ido cambiando considerablemente (Nicolson, 2013). Actualmente, se habla del concepto de la membrana celular como medio importante para la transducción de señales y activación de rutas de señalización tanto de supervivencia y proliferación como de muerte celular, entre otros procesos biológicos (Gajate & Mollinedo, 2011; George & Wu, 2012; Nicolson, 2013). Todos esos procesos de compartimentalización celular se llevan a cabo en los denominados microdominios lipídicos de membrana “rafts” (LR). Estos dominios se caracterizan por tener una composición de proteínas y lípidos específica, entre los que se encuentran el colesterol, esfingolípidos, fosfolípidos y proteínas transmembrana (usualmente receptores de membrana) (**Tabla Nº 5**). Esta composición hace que sean resistentes a la solubilización por detergentes a bajas temperaturas, lo que facilita su aislamiento y caracterización (de Laurentiis et al, 2007; Simons & Toomre, 2000).

	LÍPIDOS	MARCADOR PROTÉICO	RECEPTORES PROTÉICOS	PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN
MICRODOMINIOS RAFT NO CAVEOLARES	Colesterol	Flotilina 1 y 2	Fas/CD95	Ras
	Glicoesfingolípidos		EGFR	Scr
	Esfingomielina		HER2	Erk2
	Gangliósido GM1		IGF-1R	Shc
	Glangliósido GM2		CD44	
			ER	
CAVEOLA	Colesterol	Caveolina 1, 2 y 3	Fas/CD95	Ras
	Glicoesfingolípidos		EGFR	Scr
	Esfingomielina		JER2	eNOS
	Gangliósido GM1		IGF-1R	PI3K
			CD44	Fosfolipasa C
			ER	
			uPAR	
			MMP-1, -2, -9	

Tabla Nº 5: Clasificación y composición de los microdominios lipídicos de membrana rafts: Los microdominios de membrana *raft* se dividen en dos tipos, los microdominios *raft* no caveolares o planos y las caveolas. La composición de estos microdominios de membrana, depende del tipo de *raft*, y se basa en la presencia o ausencia de caveolina en su estructura. Esta proteína da las características de invaginación a las caveolas, a diferencia de los *rafts* planos que no la poseen en su estructura (Irina S. Babina, (2011)).

La concentración de colesterol en los LR puede ser de 3 a 5 veces mayor que en resto de la membrana celular. Por otra parte, la esfingomielina puede formar entre el 10 y el 15%

del contenido lipídico total, los glicosfingolípidos forman entre un 10-20% y los glicerofosfolípidos tienen un porcentaje menor al 30% (Irina S. Babina, (2011)).

Existen dos tipos diferentes de LR que se diferencian principalmente por su composición. Los *rafts* planos, que están en continuación con la membrana plasmática y no presentan ninguna característica morfológica. La caveola ("*caveolae*"), que además de los componentes característicos de los LR, contienen caveolina. La presencia de ésta proteína hace que este dominio de membrana forme invaginaciones con una morfología específica (*flask shaped invaginations*), este tipo de dominios son los más comunes (**Figura N° 10**).

Existen múltiples maneras en las que las proteínas pueden ser reclutadas dentro de estos dominios de membrana. El principal mecanismo es la unión de grupos glucosilfosfatidil-inositol (*GPI*) o por modificación lipídica como es el caso de la palmitoilación. Estos grupos lipídicos son adicionados a los polipéptidos solubles en el lumen del retículo endoplasmático promoviendo la unión a los lípidos de membrana (Helms & Zurzolo, 2004; Patra, 2008). La palmitoilación es producida por las palmitoil-transferasas, este proceso favorece la lipofilicidad de las proteínas, incrementando su afinidad por estos microdominios de membrana. Existen muchas proteínas que son dirigidas a través de la palmitoilación, es el caso de la flotilina, las quinasas de la familia scr, la óxido nítrico sintasa y varios receptores transmembrana (Arcaro et al, 2007; de Laurentiis et al, 2007; Patel & Insel, 2009).

6.1 PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA "RAFTS"

Los LR han sido implicados en diversos procesos celulares tales como la transducción de señales, apoptosis, organización del citoesqueleto, organización de proteínas durante la exocitosis y la endocitosis, tráfico de colesterol, etc. Los LR median el tráfico de lípidos y proteínas que favorecen la regulación dinámica de las rutas de señalización celular. Los LR pueden tener efecto sobre el tipo de señal, esto está relacionado con el tipo de *raft*, el tipo de molécula que es reclutada en el dominio y la localización primaria del mismo, aumentando así la especificidad de la señal. De la misma manera, se ha descrito que el funcionamiento de la proteína reclutada puede ser completamente diferente dependiendo de si se encuentra dentro o fuera del dominio de membrana, controlando la señalización celular. Es el caso de proteínas como Erk, EGFR, IR y PDGF. Además de la regulación de la señal, los LR están involucrados en procesos de endocitosis, promoviendo la internalización de receptores y moléculas de señalización (Helms & Zurzolo, 2004; Irina S. Babina, (2011); Patra, 2008). Una vez se produce la unión ligando-receptor, se produce una serie de acontecimientos intracelulares, es el caso de fosforilaciones de tirosina quinasas y serina/treonina quinasas, en donde los LR tienen un papel activo para que se lleve a cabo el proceso, de manera que el complejo protéico esté protegido de enzimas que no se encuentren en los LR, principalmente fosfatasas (Das, 2011) (**Figura N° 11**).

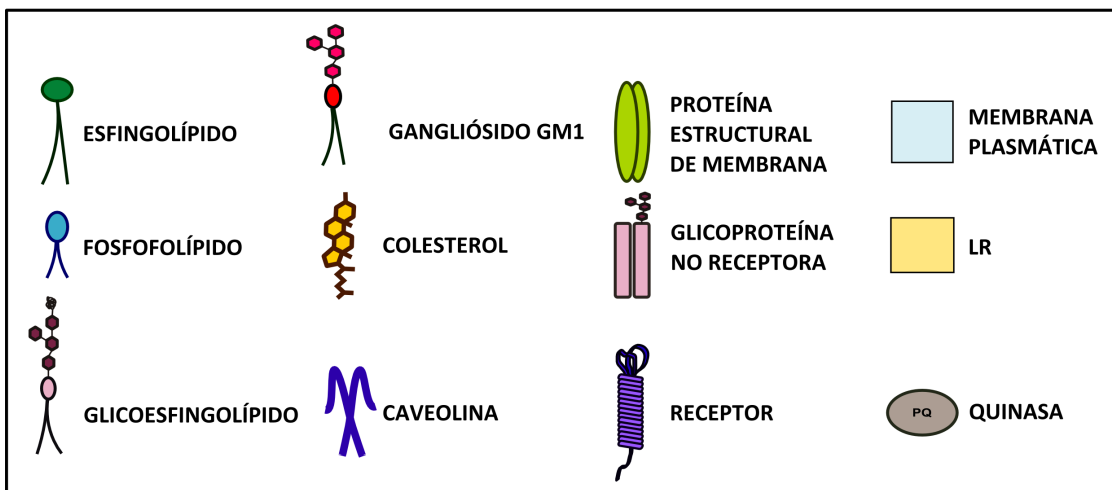
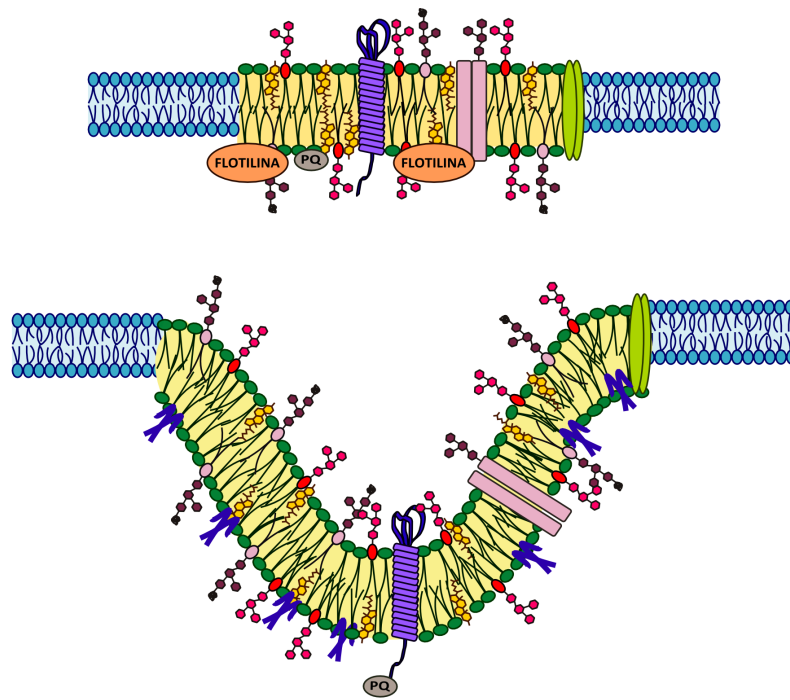


Figura Nº 10: Tipos de microdominios de membrana rafts y composición: Existen dos tipos de LR **A.** LR planos que contienen flotilina que es un marcador específico y **B.** Caveolas que contienen caveolina que da forma de invaginación y su presencia es característica de estos dominios de membrana. Tomado y adaptado de (Irina S. Babina, (2011); Patra, 2008)

Como se ha mencionado en apartados anteriores existen varias rutas de señalización en la que los LR tienen un papel fundamental, entre ellas encontramos la ruta extrínseca de la apoptosis, y la activación de los receptores tirosina quinasa que inducen la activación de la ruta de PI3K/Akt, que son rutas fundamentales en la homeostasis celular (**Figura Nº 11**).

Aunque los LR se han implicado en el correcto funcionamiento de varias rutas de supervivencia, es a partir del año 2001 cuando por primera vez se describe la implicación de los LR en la regulación directa de apoptosis actuando como dominios de membrana donde se

recluta el receptor de muerte Fas/CD95 (Gajate & Mollinedo, 2001). Estudios posteriores han demostrado que los LR sirven como andamiajes para el reclutamiento de receptores de muerte y proteínas de señalización “*downstream*” facilitando la formación del complejo DISC y la activación de la señalización apoptótica (Gajate et al, 2004; Gajate et al, 2009; Gajate & Mollinedo, 2007; Mollinedo & Gajate, 2006). Además, el reclutamiento y activación de Fas/CD95 en LR es independiente de su ligando natural (FasL) (Gajate et al, 2004; Gajate & Mollinedo, 2001; George & Wu, 2012; Mollinedo & Gajate, 2006{George, 2012 #137) y puede ser modulado farmacológicamente, por lo que se abre una nueva opción terapéutica para la regulación de la muerte celular (**Figura N° 11**).

Así como la formación de los LR favorece la formación de complejos proteicos que facilitan la señalización de muerte, estos dominios pueden favorecer el reclutamiento de receptores tirosina quinasa que activan la señalización mediada por PI3K y Akt, además de estabilizar la membrana para que se favorezca la fosforilación en su parte interna para que se lleve a cabo el proceso de PIP₂ a PIP₃ y favoreciendo la fosforilación de Akt y de PDK1. Favoreciendo la supervivencia y la proliferación celular (Arcaro et al, 2007; Calay et al, 2010; Pizon et al, 2011)(**Figura N° 11**) .

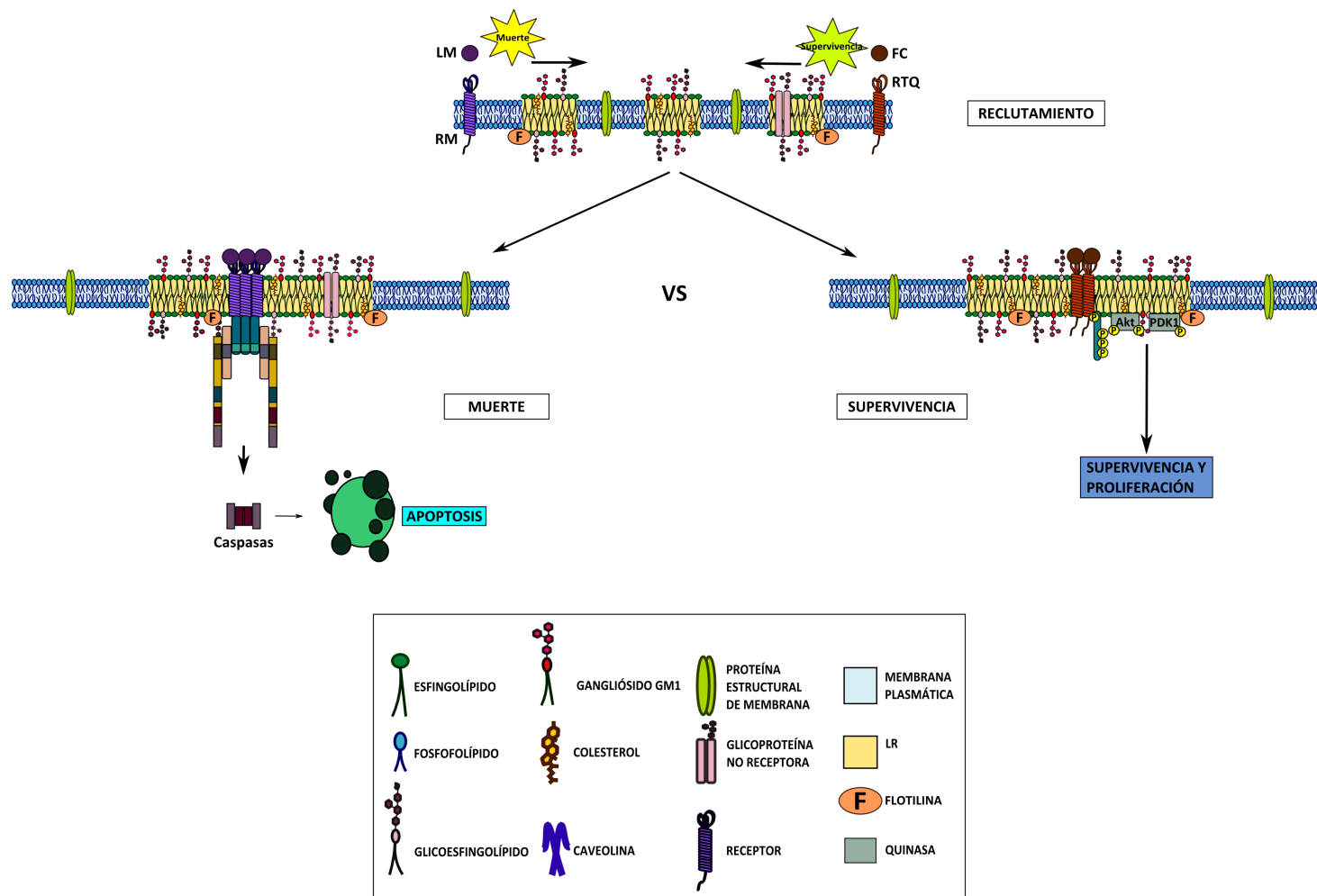


Figura Nº 11: Regulación y ensamblaje de los microdominios de membrana "rafts" y activación de rutas de señalización: Por efecto de estímulos externos o ligandos específicos de los receptores se produce el ensamblaje y reclutamiento de proteínas específicas en los LR según el tipo de señal sea de muerte o supervivencia, desencadenando la activación de la ruta de señalización correspondiente.

7. LÍPIDOS ANTITUMORALES

A partir de los primeros resultados en los que se observó que los lípidos antitumorales (ATLs) podían modificar la respuesta biológica de células tumorales como de otros organismos, se han intensificado los estudios que buscan determinar el mecanismo de acción de este grupo de compuestos con miras a ofrecer una posible acción terapéutica.

El primer ATL fue sintetizado como análogo de la 2-lisofosfatidilcolina (1-acil-*sn*-glicero-3-fosfolina, LPC), con el objetivo de encontrar compuestos con actividad inmunomoduladora. Este proceso se realizó en 1960 cuando Herbert Fisher y Paul Gerhard Munder y col., encontraron que la fosfolipasa A₂ mediaba la formación de LPC en macrófagos durante la fagocitosis de partículas de cuarzo silicogénicas y en respuesta a las sustancias con actividad adyuvante. En este estudio se encontró que la LPC exógena aumentaba fuertemente la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales tanto *in vivo* como *in vitro*. La LPC natural era rápidamente metabolizada por una aciltransferasa a fosfatidilcolina, así que se sintetizaron moléculas análogas estructuralmente de LPC con vida media larga, haciéndolos resistentes a la acción de estas enzimas. En esta síntesis se hizo particular énfasis en la cadena de glicerol en las posiciones del C1 y C2 de la molécula de LPC, reemplazando los enlaces éster por éter con el objetivo de obtener análogos incapaces de ser metabolizados por aciltransferasas o lisofosfolipasas. Algunos de estos análogos resultaron ser inmunomoduladores; también se encontró que algunos de estos éter lípidos tenían fuerte actividad antitumoral *in vitro e in vivo* de una manera selectiva. Entre los LPC sintetizados, edelfosina, resultó ser el compuesto con mayor actividad, y rápidamente pasó a ser el estándar más efectivo en ensayos de actividad antitumoral de estos éter lípidos (Andreesen et al, 1979; Gajate & Mollinedo, 2002; Modolell et al, 1979; Mollinedo et al, 2004).

Se han descrito otras aplicaciones de los ATLs, entre las que cabe destacar el tratamiento frente a protozoos parásitos. Los primeros ensayos clínicos en relación a la actividad antitumoral de los ATLs fueron realizados en los años 80 con edelfosina, con resultados poco satisfactorios. Otros usos de los ATLs fueron más eficaces; la miltefosina fue aprobada para el tratamiento de metástasis cutánea de cáncer de mama y, posteriormente, para el tratamiento de la leishmaniasis (Croft et al, 1996; Smorenburg et al, 2000)

7.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Los ATLs son compuestos de origen sintético con semejanza estructural a los fosfolípidos. Se ha desarrollado dos grupos principales de compuestos, cuya diferencia estructural radica

en la presencia o ausencia de la cadena principal de glicerol. Existen dos grupos de compuestos:

- Los **alquil-eter-fosfolípidos o ATLS de primera generación**: A los que se refieren como éter lípidos antitumorales o análogos alquil-lisofosfolípidos, los cuales tienen un enlace éter en la cadena principal de glicerol del fosfolípido (posiciones *sn-1* y *sn-2*). En este grupo encontramos al 1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH₃; edelfosina) que es su compuesto prototipo (Gajate & Mollinedo, 2002). Las estructuras químicas de estos ATLS se describen en la **Figura Nº 12**.
- Las **alquifosfocolinas o ATLS de segunda generación**: Carecen de la cadena principal del glicerol y está formado por una larga cadena simple de alcohol esterificada en la fase fosfatídica. En este grupo tenemos a la hexadecilfosfocolina (HPC, Miltefosina). Las características moleculares de estos ATLS se muestran en la **Figura Nº 12**.

Se han ido sintetizando diferentes análogos que han mostrado una prometedora actividad antitumoral. Estos análogos incluyen 1-hexadeciltio-2-metoximetil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (BM 41.440, ilmofosine), el análogo cíclico SRI 62-834, octadecil-(*N,N*-dimetilpiperidinio-4-il)-fosfato (D 21266, perifosina), y erucilfosfocolina (**Figura Nº 12**). Este tipo de compuestos presentan unas bajas tasas de metabolismo *in vitro* e *in vivo*, no actúan sobre el ADN, y ejercen su acción antitumoral al nivel de la membrana celular (Gajate & Mollinedo, 2001; Mollinedo & Gajate, 2006; Mollinedo et al, 2004).

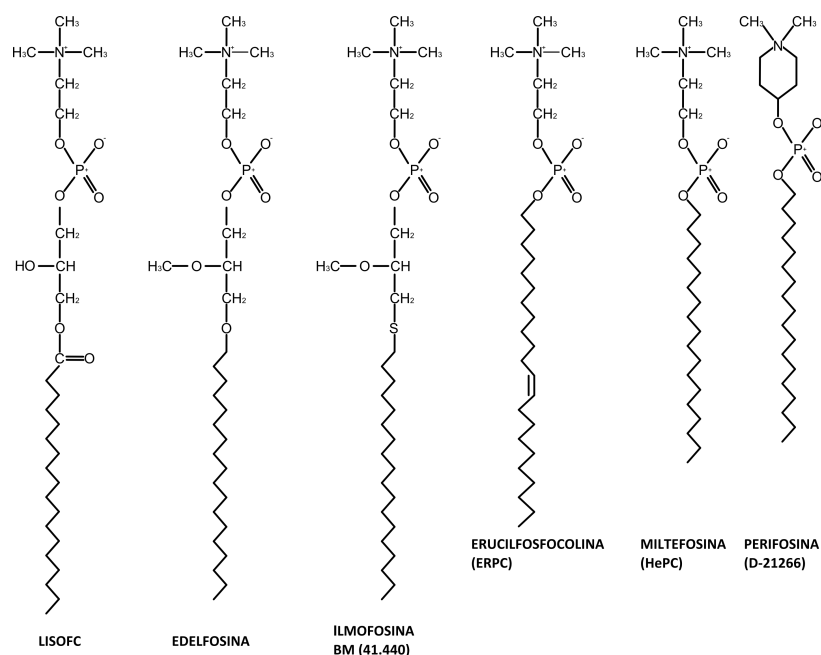


Figura Nº 12: Estructura química de los diferentes ATLS.

7.2 MECANISMO DE ACCIÓN

A diferencia de los fármacos empleados en terapéutica en la actualidad, cuya diana principal es el ADN (agentes alquilantes, análogos de bases nitrogenadas, compuestos de platino, etc.), los ATLS se caracterizan por actuar al nivel de la membrana celular (Gajate & Mollinedo, 2011; Mollinedo & Gajate, 2006). Esta interacción de los ATLS con la membrana se debe principalmente a sus características estructurales, ya que al tener una cadena apolar hidrocarbonada, los ATLS se insertan fácilmente en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, produciendo una alteración en la conformación de la misma y afectando a una serie de eventos, principalmente: estrés celular, desregulación de las rutas antiapoptóticas, inhibición del crecimiento, arresto del ciclo celular, que finalmente desencadena una respuesta apoptótica (Mollinedo & Gajate, 2006; Reis-Sobreiro et al, 2013; Ríos-Marco et al, 2013; van Blitterswijk & Verheij, 2013). Esto indica que las células tumorales poseen una maquinaria apoptótica suficientemente funcional y susceptible de ser activada en determinadas condiciones, pero son capaces de evadir los mecanismos fisiológicos de control celular que, en células sanas, provocarían su muerte por apoptosis. El mecanismo de acción de la edelfosina implica la activación de la apoptosis, propiedad que posteriormente se ha extendido a otros ATLS. La edelfosina es capaz de inducir una apoptosis selectiva en las células tumorales y su acción proapoptótica se asocia con la incorporación del éter lípido en la célula cancerígena (Gajate et al, 2000a; Mollinedo et al, 1997; Vink et al, 2007) (**Figura Nº 13**).

Varios estudios han demostrado las posibles dianas de los ATLS, todas relacionadas con la membrana celular, tanto a nivel de síntesis de sus componentes como alteraciones en la funcionalidad de la misma, y posteriores efectos en otros orgánulos.

7.2.1 Efectos sobre el metabolismo de lípidos:

Se ha descrito que los ATLS se localizan en la membrana plasmática como en membranas intracelulares. Así mismo, se ha demostrado que son capaces de inhibir la síntesis de fosfatidilcolina, uno de los componentes principales de la membrana plasmática, y además afecta a la síntesis de varias moléculas lipídicas implicadas en la señalización celular en la membrana (Nieto-Miguel et al, 2007; Nieto-Miguel et al, 2006; van Blitterswijk & Verheij, 2012) (**Figura Nº 13**).

7.2.2 Estrés en el retículo endoplasmático:

Varios estudios han revelado un papel del retículo endoplasmático (RE) en la inducción de apoptosis por ATLS. Se ha observado la acumulación de análogos fluorescentes de la edelfosina en ese orgánulo, se ha sugerido que los ATLS son

capaces de producir estrés de RE mediante la incorporación a las membranas del orgánulo y la desregulación del calcio acumulado en su interior. El estrés continuado provocado por los compuestos induce apoptosis mediante la activación de caspasas y la participación de la mitocondria (Gajate et al; Nieto-Miguel et al, 2007) (**Figura Nº 15**).

7.2.3 Efecto sobre rutas de señalización:

Se ha descrito que los ATLs son capaces de inhibir la función de la proteína quinasa C (PKC). Estas quinasas son importantes en la regulación por fosforilación de otras proteínas. Por otra parte, se ha observado que estas quinasas pueden ser activadas por diacilglicerol (DAG). En algunos casos se ha encontrado que la estimulación con análogos de DAG favorecen la progresión tumoral, lo que sugiere que la inhibición de DAG puede ser una diana potencial para el tratamiento del cáncer. La inhibición de DAG se ha descrito como una de los primeros efectos de la edelfosina, esta inhibición se produce por el impedimento en la unión de las PKC en las membranas ricas en DAG, inhibiendo por tanto la activación por fosforilación (Helfman et al, 1983). Sin embargo, en otros estudios se ha mostrado que este agente antitumoral puede generar activación de PKC, que el efecto sobre PKC es dependiente del tipo celular, y de que la actividad citotóxica de los ATLs es independiente de la actividad quinasa (Heesbeen et al, 1991)

Otras de las rutas de señalización que se han visto afectadas por la edelfosina, a concentraciones apoptóticas, son la inactivación de la ruta de las MAPK/Erk y de la ruta de supervivencia de PI3K/Akt. En varios estudios se ha encontrado que los ATLs atenúan la ruta de señalización MAPK/Erk al nivel de Ras/GRP y Raf-1, impidiendo su translocación a la membrana (Dineva et al, 2012). Así se favorece la activación de la ruta de señalización proapoptótica por JNK. La fosforilación de JNK ha de ser persistente para que de paso a la activación de la apoptosis por edelfosina (Gajate et al, 1998; Nieto-Miguel et al, 2008; Nieto-Miguel et al, 2006) (**Figura Nº 13**).

Uno de los compuestos más estudiados a nivel de las rutas de supervivencia es la perifosina, cuyo mecanismo de acción principal es la inhibición de la fosforilación de Akt. Esta inhibición está relacionada con que la perifosina inhibe la unión de Akt a la membrana plasmática en el dominio pleckstrin, inhibiéndose la conformación apropiada de la proteína para la correcta fosforilación de la misma en los aminoácidos Thr308 y Ser473 (Reis-Sobreiro et al; Ruitter et al, 2003) (**Figura Nº 13**).

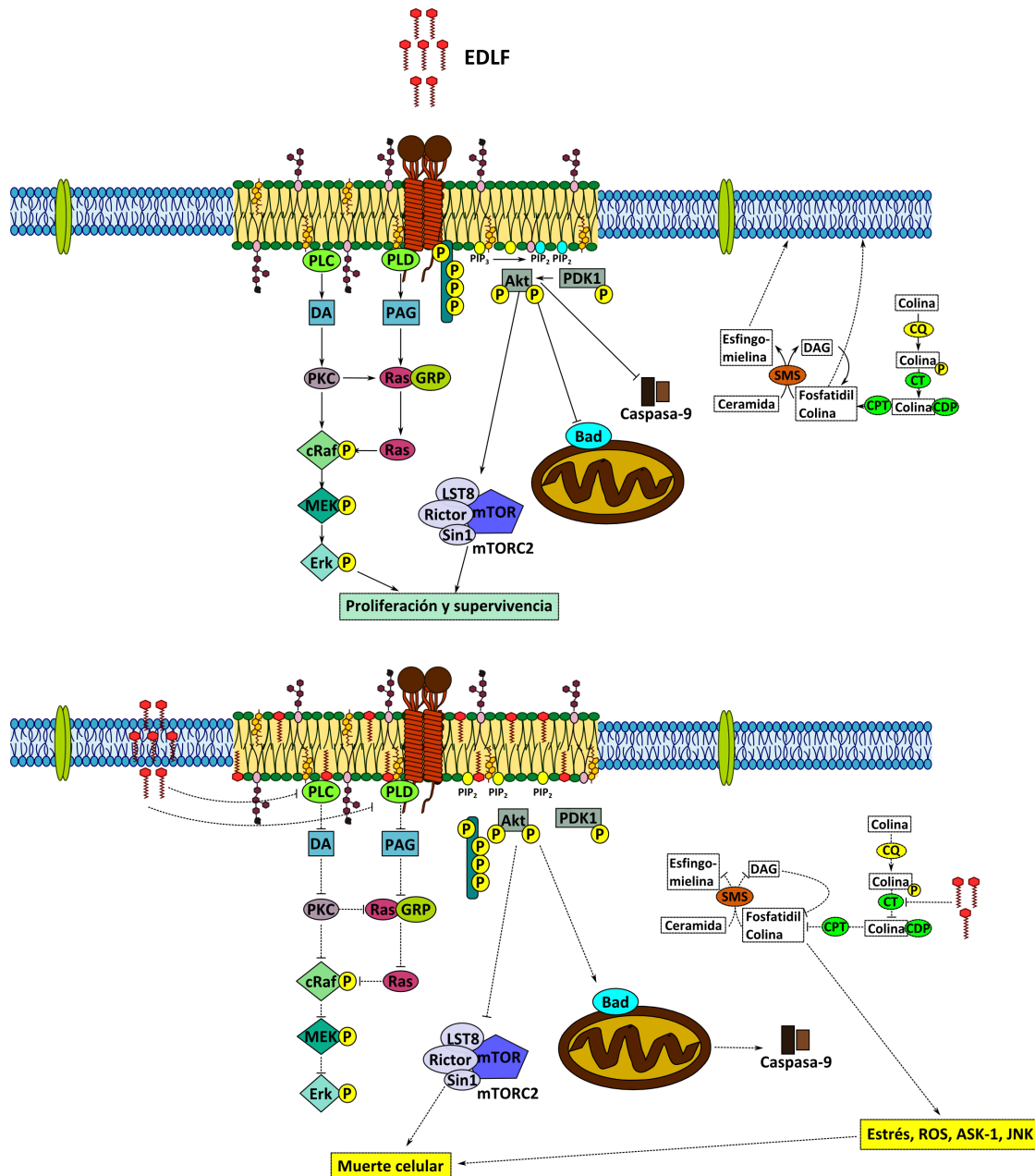


Figura N° 13: Mecanismos moleculares implicados en la acción antitumoral de edelfosina y análogos. En esta figura se muestran las diferentes rutas de señalización implicadas en el mecanismo de acción de estos ATLS. Inicialmente hay una incorporación del agente antitumoral y acumulación en la membrana plasmática. Se han descrito alteraciones en las rutas de señalización como las MAPKS y PI3K/Akt, alteraciones en la síntesis de fosfatidilcolina, que resultan en la activación del respuesta apoptótica (Gajate & Mollinedo, 2002; van Blitterswijk & Verheij, 2008).

7.2.4 Actividad proapoptótica inducida por estrés celular:

Los ATLS pueden activar la ruta de señalización SAPK/JNK, la activación viene mediada por ASK-1, que es activada mediante varios estímulos de estrés, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés de retículo endoplasmático. Edelfosina específicamente induce la activación de la ruta de SAPK/JNK por la activación de ASK-1, esta actividad es dependiente del tiempo y de

la dosis (Nieto-Miguel et al, 2007). De la misma manera se ha comprobado que la edelfosina induce estrés de retículo endoplasmático, la activación de ASK-1/JNK puede ocurrir “downstream” a causa del estrés inducido por los ATLS (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007). Se conoce que los ATLS provocan la formación de especies reactivas de oxígeno, que pueden ser un fuerte inductor de apoptosis (Mollinedo et al, 2011; Selivanov et al, 2010; Wagner et al, 1998).

7.2.5 ATLS inducen el reclutamiento del receptor de muerte Fas/CD95 en los microdominios de membrana “rafts”:

Estudios realizados por nuestro laboratorio describen, por primera vez en el mecanismo de acción de edelfosina, el reclutamiento del receptor de muerte Fas/CD95 y su activación independiente de su ligando FasL en los microdominios de membrana *rafts*, activando la ruta extrínseca de la apoptosis (Gajate & Mollinedo, 2001). De la misma manera, se ha descrito que la incorporación de este ATL y la presencia del receptor Fas/CD95 son aspectos importantes para que se lleve a cabo la respuesta apoptótica de la célula tumoral (Gajate et al, 2000a; Mollinedo et al, 2004). Posteriormente se encontró que, tanto en células leucémicas como de mieloma múltiple, además del reclutamiento del receptor Fas/CD95 en los microdominios lipídicos y la formación del complejo DISC, se producía un reordenamiento de otras proteínas apoptóticas “downstream” como la procaspasa-10, la JNK y Bid, así como otros receptores de muerte de TRAIL como DR4 y DR5 (Gajate et al, 2009; Gajate & Mollinedo, 2007; Mollinedo, 2009; Nieto-Miguel et al, 2008). En este mismo sentido, se estudió la importancia del colesterol en estos microdominios de membrana para el mecanismo de activación apoptótica de edelfosina, encontrándose que su depleción impide el reclutamiento de los receptores de muerte, así como de proteínas “downstream” en los dominios de membrana *rafts*, inhibiéndose la activación de la apoptosis. Esto se observó en células tumorales leucémicas y de mieloma múltiple (Gajate & Mollinedo, 2011; Mollinedo et al, 2010a; Mollinedo et al, 2010b; Mollinedo & Gajate, 2006). El mecanismo de reclutamiento del receptor Fas/CD95 en los microdominios de membrana *rafts* por edelfosina se describe en la **Figura N° 14**.

7.2.6 Efecto sobre la mitocondria:

La edelfosina induce apoptosis a través de la mitocondria mediante dos mecanismos diferentes que dependen del tipo de tumor. En el caso de tumores hematológicos se ha descrito la implicación de la mitocondria a través de la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis por reclutamiento en los microdominios de membrana *rafts* y por la inhibición de la quinasa Akt en estos

mismos dominios (Gajate & Mollinedo, 2007; Mollinedo et al, 2011; Reis-Sobreiro et al, 2013). En el caso de tumores sólidos, se ha descrito que la participación de la mitocondria en el proceso apoptótico está relacionada con el estrés de retículo endoplasmático y la variación en los niveles de calcio citoplasmático activándose la ruta intrínseca de la apoptosis (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007).

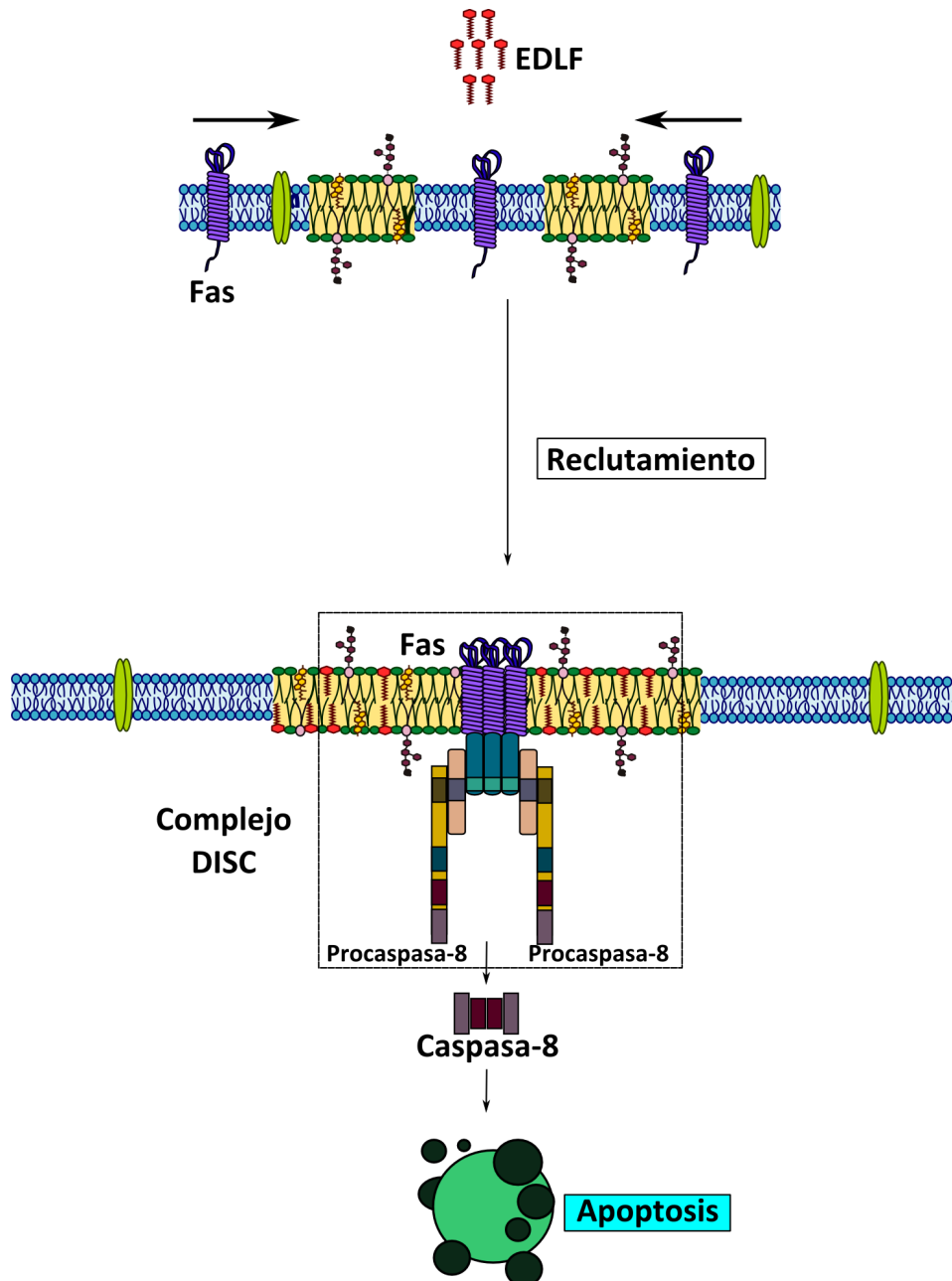


Figura N° 14: Reclutamiento del receptor de muerte Fas/CD95 en los microdominios de membrana rafts tras el tratamiento con edelfosina en líneas celulares hematológicas. Tras el tratamiento con edelfosina se produce la incorporación de la misma y el agrupamiento de los microdominios de membrana rafts. Una vez se reagrupan, es reclutado el receptor de muerte Fas/CD95 junto con proteínas del complejo DISC para dar paso a la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis (Gajate et al, 2009; Gajate & Mollinedo, 2001; Mollinedo & Gajate, 2006).

El mecanismo general de la disfunción mitocondrial y activación de la apoptosis se inicia con un cambio en el potencial de membrana mitocondrial, seguido por la producción de ROS y liberación de citocromo c. Como consecuencia se aprecia una activación de la caspasa-3 como desencadenante principal de la apoptosis (Gajate et al, 2000b; Mollinedo et al, 2011).

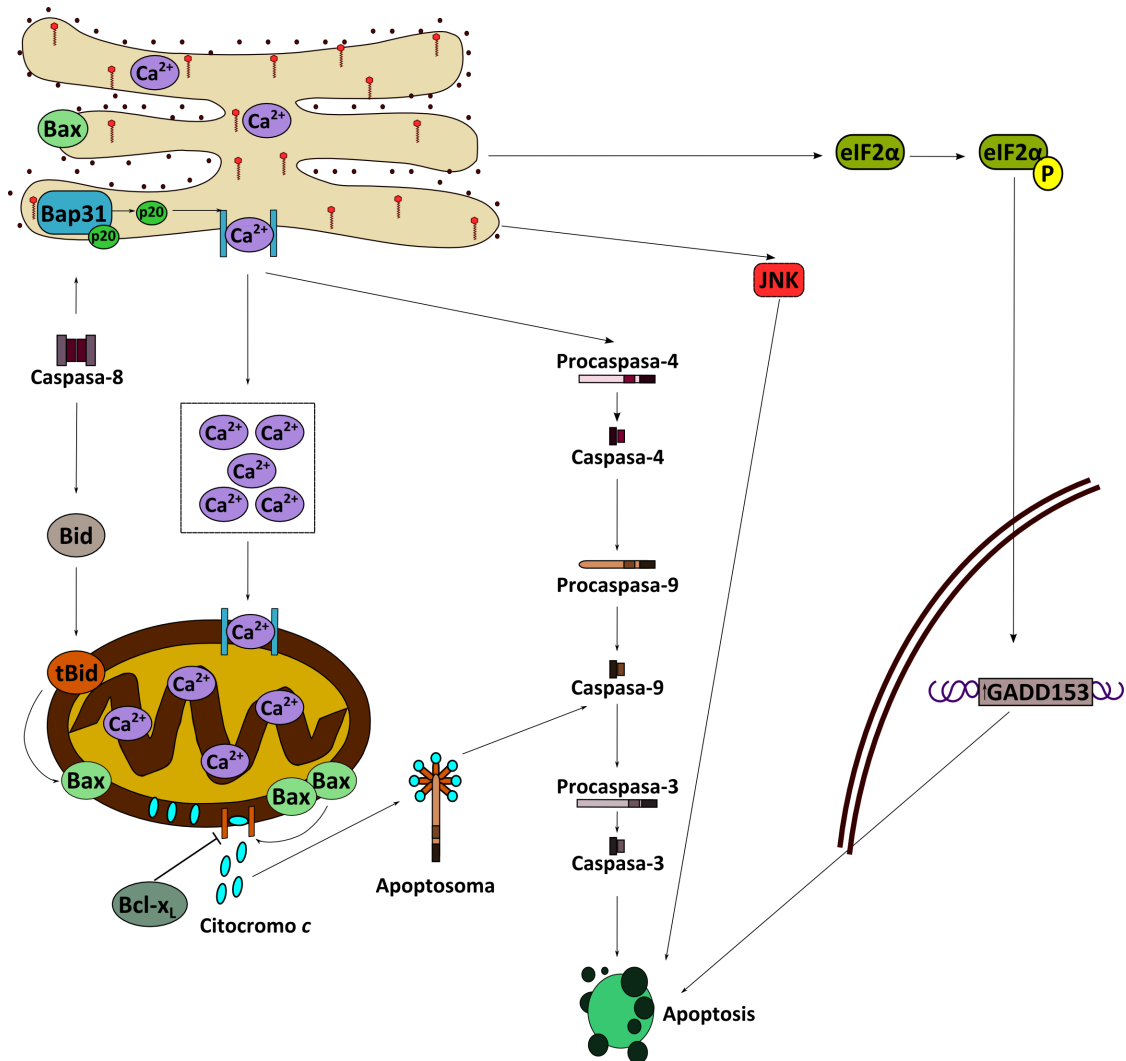


Figura Nº 15: Mecanismo de acción de edelfosina por estrés en el retículo endoplásmico: En esta figura se muestran los mecanismos moleculares implicados en el estrés de retículo endoplásmico y activación de la cascada apoptótica tras el tratamiento con edelfosina en tumores sólidos. Tomado y adaptado de (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007)

7.3 ESTUDIOS CLÍNICOS

Al descubrirse la capacidad antitumoral *in vitro* de los ATLs se planteó su potencial empleo en el tratamiento del cáncer. Estudios en animales mostraron eficacia frente a diversos tipos de tumores por parte de edelfosina, ilmofosina, miltefosina o perifosina (Berdel et al, 1980; Herrmann et al, 1990; Mollinedo et al; Scherf et al, 1987; Unger et al,

1989), a concentraciones que producían una toxicidad reducida. Los ATLs, al tener actividad tensioactiva, tienen efecto hemolítico, por lo que la administración por vía oral es mejor que vía intravenosa. Los efectos hemolíticos pueden atenuarse mediante la administración de los compuestos en liposomas (Ahmad et al, 1997; Fichtner et al, 1994; Zeisig et al, 1998). Los ensayos clínicos realizados con ATLs como único agente no han tenido la eficacia esperada.

Entre los efectos secundarios habituales se encuentran náuseas, irritación gastrointestinal y vómitos. Los limitados estudios realizados con edelfosina e ilmofosina no demostraron una mejoría significativa en los pacientes (Woolley et al, 1996). La edelfosina provoca una alta toxicidad en células leucémicas con una elevada especificidad, afectando en menor grado a las células progenitoras de la hematopoyesis sana. Una de las aplicaciones propuestas de la edelfosina es como agente de “*purging*” de células cancerosas provenientes de la médula ósea, empleada en trasplante autólogo en pacientes con leucemia. Un ensayo clínico en fase II arrojó resultados positivos (Vogler et al, 1996). La miltefosina y la perifosina han sido también objeto de ensayos clínicos frente a varios tipos de cáncer (Argiris et al, 2006; Ernst et al, 2005; Knowling et al, 2006; Planting et al, 1993; Posadas et al, 2005). A día de hoy la única de las aplicaciones de un ATL como agente antitumoral que ha entrado en la clínica es tratamiento de metástasis cutánea de cáncer de mama mediante administración por vía tópica de miltefosina (Leonard et al, 2001). Se desconoce la razón de la diferencia entre los resultados observados en modelos animales y en pacientes humanos. Se ha especulado que, al contrario que en cultivos celulares *in vitro*, los ATLs son significativamente metabolizados *in vivo* en el hígado, lo que reduciría la biodisponibilidad efectiva de los compuestos (Magistrelli et al, 1995).

A pesar de su baja eficiencia clínica encontrada hasta el momento, se ha propuesto que los ATLs podrían, a través de los diversos efectos que ejercen en las células, sensibilizar las células a otros tratamientos más eficaces.

El tratamiento con ATLs es eficaz *in vitro* contra parásitos del género *Leishmania*, en modelos animales (Kuhlencord et al, 1992; Varela et al, 2012) y en pacientes humanos. De hecho, la aplicación clínica más extendida de un ATL es el tratamiento con miltefosina de la leishmaniasis visceral, empleada en los últimos años en la India para el tratamiento de enfermos con kala-azar (Sundar et al, 2006). Otros parásitos han mostrado también sensibilidad frente a ATLs, tales como: *Trypanosoma* spp. (Croft et al, 1996) o *Entamoeba histolytica* (Seifert et al, 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Dado que el ATL edelfosina se comporta como un potente inductor de la muerte celular por apoptosis en diversos tipos de células cancerosas, y una característica fundamental de la célula tumoral es una deficiente respuesta a sufrir apoptosis, el presente trabajo de Tesis se centró en el estudio de la posible acción proapoptótica de los ATLs, en particular edelfosina, en células de sarcoma de Ewing (SE) y de cáncer de cabeza y cuello, como una posible terapia proapoptótica en estos tumores.

Los objetivos concretos que se plantearon en este estudio fueron los siguientes:

1. Analizar si los ATLs, y específicamente edelfosina como agente que activa directamente la maquinaria apoptótica, pueden constituir una herramienta terapéutica novedosa para el tratamiento de los tumores de sarcoma de Ewing y de cáncer de cabeza y cuello.
2. Elucidar el mecanismo de acción de la edelfosina en la inducción de apoptosis en células de SE y de cáncer de cabeza y cuello (CCC). Concretamente analizar si dicho mecanismo de acción implica al retículo endoplásmico, mitocondria y dominios de membrana *rafts*.
3. Análisis *in vivo* de la eficacia antitumoral de la edelfosina en un modelo animal de ratones inmunodeprimidos con xenotrasplantes de líneas celulares de SE humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares empleadas en este trabajo se adquirieron de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Alemania):

1.1.1 Tumores De Cabeza y Cuello (CCC):

Línea celular CAL 27 (Human Tongue Squamous Cell Carcinoma; DSMZ No: ACC 446)

Línea celular CAL 33 (Human Tongue Squamous Cell Carcinoma; DSMZ No: 447)

1.1.2 Sarcoma de Ewing (SE):

Línea celular CADO-ES1 (Human Ewing's Sarcoma; DSMZ No: ACC 255)

Línea celular RDES (Human Ewing's Sarcoma; DSMZ No: ACC260)

1.2 CULTIVOS CELULARES

1.2.1 Medios de cultivo

RPMI-1640, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) conteniendo 25 mM HEPES, Suero Fetal Bovino inactivado, Penicilina (1000 UI/mL), Estreptomicina (1000 µg/mL), L-Glutamina (200 mM), Tripsina/EDTA 0.05% de rojo fenol, obtenidos de GIBCO-BRL Life Technologies (Gaithersburg, MD, EE.UU).

Tampón Fosfato Salino (PBS 1X Na⁺/K⁺): KCl 0.02%, NaCl 0.8%, KH₂PO₄ 0.02%, Na₂HPO₄ 0.11%.

1.3 LÍPIDOS ANTITUMORALES EVALUADOS

- Edelfosina (EDLF) (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) (INKEYSA, Barcelona, España); Perifosina (PERIF) (Octadecil-(*N,N*-dimetilpiperidinio-4-il)fosfato) (Zentaris, Frankfurt, Alemania); Miltefosina (MILTEF) (Hexadecilfosfocolina) (Calbiochem, Cambridge, MA, EE.UU); Erucilfosfocolina (ERPC) (*cis*-13-docosenilfosfocolina) (Zentaris, Frankfurt, Alemania).

- Análogo fluorescente de EDLF (Et-BDP-ET). Sintetizados y suministrados por Francisco Amat-Guerri y A. Ulises Acuña (CSIC, Madrid, Spain). EL método de obtención, las características estructurales y la actividad apoptótica de este análogo fluorescente de Edelfosina se describen en (Gajate et al, 2011; Mollinedo et al, 2011).

1.4 ANTICUERPOS

En la **Tabla Nº 6**, se indican los anticuerpos empleados para la detección de proteínas mediante Western blot (WB), inmunofluorescencia (IF), estudios de colocalización por inmunofluorescencia empleando microscopía confocal (IFC), inmunofluorescencia por citometría de flujo (CF) e inmunohistoquímica (IHC).

Tabla No 6: Anticuerpos empleados: En la tabla se muestra cada uno de los anticuerpos empleados para el análisis de proteínas por Western blot (WB), inmunofluorescencia por citometría de flujo (CF), colocalización de orgánulos mediante microscopía confocal (IFC) e inmunohistoquímica (IHC). Se describe el origen del anticuerpo, la dilución empleada, el peso molecular de la(s) banda(s) reconocida(s) y la compañía que lo produce. Las formas fosforiladas de los anticuerpos empleados se indican con la letra “p” anterior al nombre del anticuerpo; entre paréntesis se describe el residuo fosforilado que reconoce cada anticuerpo.

ANTICUERPO	COMPAÑÍA	ORIGEN (IgG)	PESO MOLECULAR (kDa)	TÉCNICA	DILUCIÓN
Anti-active Caspase-3, Monoclonal	BD Pharmingen™	Rabbit	20	WB, IHC	1:1000
Anti-Human Caspase-7, Monoclonal	BD Pharmingen™	Mouse	Proforma: 34, Activa : 20	WB	1:1000
PARP (Poly(ADP-Ribose) Polimerase)	BD Pharmingen™	Mouse	116, 85	WB	1:1000
Anti β-Actin, Monoclonal (Clone AC15) Mouse Ascites Fluid	Sigma®	Mouse	42	WB	1:1000
Caspase-4 p20 (N-15): sc-1229, Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology®	Goat	Proforma: 50, Activa : 20	WB	1:1000
GADD153 (R-20): sc-793	Santa Cruz Biotechnology®	Rabbit	30	IHC	1:100
BAP31 (C-15): sc-18579	Santa Cruz Biotechnology®	Goat	29/31	WB	1:1000
Phospho eIF2α (Ser51)(119A11)	Cell Signaling Technology®	Rabbit	38	WB	1:1000
eIF2α	Cell Signaling Technology®	Rabbit	40	WB	1:1000
GRP 78 (H-129): sc-13968	Santa Cruz Biotechnology®	Rabbit	78	WB	1:1000
Anti-Cleaved Caspase-9 (Asp¹⁵³), Polyclonal	Calbiochem	Rabbit	38	WB	1:1000
Anti-Cytochrome c	BD Pharmingen™	Mouse	15	WB	1:1000
Anti-Bax, Monoclonal	BD Pharmingen™	Mouse	21	WB	1:1000
Anti-Human Bcl-2, Monoclonal	BD Pharmingen™	Mouse	26	WB	1:1000
Bcl-x_L, Monoclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	30	WB	1:1000
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)(G9), Monoclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	46, 54	WB	1:1000
JNK2	Cell Signaling Technology®	Rabbit	54	WB	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	Cell Signaling Technology®	Rabbit	42, 44	WB	1:1000

ANTICUERPO	COMPAÑÍA	ORIGEN (IgG)	PESO MOLECULAR (kDa)	TÉCNICA	DILUCIÓN
Erk 2 (D-2): sc-1647, Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®	Mouse	42, 44	WB	1:1000
p-Akt (Ser473), Monoclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	60	WB	1:1000
Akt 1/2/3 (H-136): sc-8312, Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology®	Rabbit	60	WB	1:1000
Fas (C-20): sc-715, Polyclonal	Santa Cruz Biotechnology®	Rabbit	42	WB	1:1000
DR4 (N-19): sc-6824	Santa Cruz Biotechnology®	Goat	56	WB	1:1000
DR5 (N-19): sc-7192	Santa Cruz Biotechnology®	Goat	56	WB	1:1000
FADD	BD Pharmingen™	Mouse	24	WB	1:250
Beclin-1 (D40C5), Monoclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	60	WB	1:1000
LC3B, Monoclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	14, 16	WB	1:1000
Sobrenadante de mieloma P3X63		Mouse	---	CF	1:100
Anti-active human caspase-3, Polyclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	Subunidades p19 y p17	IHC	1:100
F-168 anti-30 kDa human CHOP/GADD153 Polyclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	30	WB/ IHC	1:1000/ 1:50
Ki 67 (D2H10) Polyclonal (IHC specific)	Cell Signaling Technology®	Rabbit	---	IHC	1:500
XIAP, Polyclonal	Cell Signaling Technology®	Rabbit	53	WB	1:1000
Survivin (6E4), Monoclonal	Cell Signaling Technology®	Mouse	16	WB	1:1000
Donkey anti-Rabbit IgG-HRP: sc-2317	Calbiochem	Rabbit	---	WB	1:1000
Rabbit anti-Mouse IgG-HRP: sc-358914	Santa Cruz Biotechnology®	Rabbit	---	WB	1:2000
Rabbit anti-Goat IgG-HRP: sc-2768	Santa Cruz Biotechnology®	Mouse	---	WB	1:2000
Cy2-Conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit/ mouse IgG	Jackson ImmunoResearch®	Rabbit/Mouse	---	WB	1:100
Cy3-Conjugated AffiniPure Goat anti Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch®	Rabbit	---	MC, IFC	1:100

2 MÉTODOS

2.1 CULTIVOS CELULARES

Las distintas líneas celulares se cultivaron y mantuvieron a 37°C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y 98% de humedad relativa. Las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello (CAL 27 y 33) se cultivaron en medio de cultivo DMEM 25 mM Hepes, y las líneas de Sarcoma de Ewing (CADO-ES 1 y RDES) se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640. Ambos medios se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C durante 45 min), 2 mM de L-Glutamina, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

2.1.1 Preparación de soluciones stock de ATLS

Los diferentes ATLS se disolvieron en medio RPMI 1640 hasta una concentración final de 2 mM. A continuación, las soluciones se esterilizaron por filtración en membrana de 0.22 µm y se almacenaron a 4°C.

2.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROAPOPTÓICA DE LOS DIFERENTES ATLS

En placas de 6 pocillos se cultivaron las líneas celulares de SE a una concentración de 250.000 células/mL, y de CCC con una confluencia del 70% aproximadamente. A las 24 h se cambió el medio de cultivo y las células se trataron con los diferentes ATLS (EDLF, PERIF, MILTEF, ERPC) a diferentes concentraciones (10, 20 y 30 µM) y a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48, 72 h). En primer lugar, se evaluó el estado de las células por microscopía óptica y a continuación se recogieron las células en tubos para citometría de flujo (12 x 75 mm), se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se resuspendieron y fijaron en etanol al 70%, para ser incubadas durante 24 h a 4°C. Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas mediante el análisis de fragmentación del ADN por citometría de flujo.

2.3 ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fijadas previamente se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min, se les retiró el etanol al 70%, se lavaron con 500 µL de PBS (KCl 0.2%, NaCl 0.8%, KH₂PO₄ 0.02%, Na₂HPO₄ 0.11%), y se centrifugaron nuevamente a 1200 rpm durante 10 min. A continuación, las células se incubaron con una solución de RNAsa A (encargada de la eliminación del ARN) en PBS a una concentración de 1 mg/mL. Las células se marcaron con Ioduro de Propidio (IP)

(fluorocromo que se une estequiométricamente al ADN de las células) a una concentración de 20 µg/mL en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. El análisis del ciclo celular se realizó mediante la técnica de citometría de flujo en el citómetro BD FACScalibur™ (Beckton Dickinson®, San Jose, CA, EE.UU) a través del programa BD Cell Quest™ (Beckton Dickinson®). La cuantificación de los porcentajes tanto de las células apoptóticas como de las diferentes fases del ciclo celular, se cuantificó mediante el programa FCS Express 4® Research Edition. El porcentaje de células de la región sub-G₁ (hipodiploidía) corresponde al porcentaje de muerte celular por apoptosis.

2.4 FRAGMENTACIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Se cultivaron 1 X 10⁶ células de las líneas de SE en placas de 10 cm de diámetro. Posteriormente, se trataron con EDLF a una concentración de 10 µM a los tiempos indicados (3, 6, 9, 15, 24 h). Una vez tratadas las células, se retiró el medio de cultivo y se emplearon 3 mL de tripsina 0.05% para desprender las células de la placa, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, y se retiró el sobrenadante. A continuación, se lavaron con 5 mL de PBS y se repitió el mismo procedimiento. Posteriormente, las células se lisaron suavemente con tampón de lisis hipotónico (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM y Tritón X-100, 0.2%) durante 30 min a 4°C. Una vez lisadas las células, se retiraron el resto de orgánulos tras centrifugar a 12.000 x g durante 20 min a temperatura ambiente (el pellet contiene los restos de orgánulos, núcleo, mientras que en el sobrenadante se encuentra el ADN liberado del núcleo de la célula debido a su fragmentación). Se recogió el sobrenadante y se incubó con 75 µg/mL de RNasa A. Tras esta incubación, se añadió Proteinasa K (200 µg/mL en SDS al 0.5%), y se incubó durante 1 h más a 37°C. Posteriormente, se extrajo el ADN con dos adiciones consecutivas de fenol, Tris/HCl, pH 7.5, y una solución de fenol: cloroformo: alcohol Isoamílico (25:24:1). A continuación, se agitaron las muestras por vórtex y debido a la separación de fases, se produjo la separación del ADN (soluble en agua), separándose del resto de componentes celulares. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se pasó a otro tubo eppendorf estéril. Para precipitar el ADN, se añadió una solución NaCl 300 mM y dos volúmenes de etanol absoluto a cada muestra, y se dejaron en incubación a -20°C toda la noche. Los pellets obtenidos, se lavaron con etanol al 70% y se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 min, se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 µL de tampón TBE 0.5X, pH 8.0. Se tomaron alícuotas de 5 µL del ADN suspendido y se mezclaron con 5 µL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xileno-cianol 0.25%, glicerol 30%, en agua estéril). Una vez preparadas las muestras, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa del 1% en tampón TBE 0.5X (Tris-HCl 45 mM, pH 8.0, ácido bórico 45 mM, 1 mM EDTA), conteniendo bromuro de etidio 0.1 mg/mL; y empleando TBE 0.5X como tampón de electroforesis. Como muestra estándar se usó la escalera ADN de 123 bp DNA Ladder (Sigma®). El ADN se visualizó por exposición a luz U.V en el transiluminador (BioRad®), y la imagen fue obtenida y tratada mediante el programa GelDoc 2000 de BioRad®.

2.5 OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE CÉLULA VIVA MEDIANTE MICROSCOPIA INVERTIDA Y SECUENCIA DE IMÁGENES POR “VIDEOMICROSCOPIA TIME LAPSE”

Esta captura de imágenes de células en cultivo se usó para observar los cambios morfológicos de las células con el paso del tiempo, mediante una secuencia de fotografías obtenidas in situ con el microscopio Nikon 2.5, a intervalos determinados de tiempo y posterior adaptación a vídeo por aumento en la velocidad en la secuencia de fotografías.

Las líneas celulares CAL 27 y CAL33 (2.5×10^5 células) se cultivaron en placas de 6 pocillos y se trataron con EDLF a una concentración 10 μ M y 30 μ M respectivamente. Las placas se ubicaron en el microscopio Nikon 2.5 y se capturaron imágenes cada 5 min del mismo campo durante todo el tiempo de tratamiento. Se realizó la secuenciación y compactación de las imágenes para la creación del vídeo, a través del programa para análisis de imágenes Metamorph®.

2.6 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE, WESTERN BLOT, E INMUNODETECCIÓN

Tras el tratamiento de 6×10^6 células de las diferentes líneas celulares en estudio con EDLF a los tiempos indicados (3, 6, 9, 15, 24, 36, 48 h), las células se trataron con tripsina 0.05% y centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. A continuación, se lavaron con PBS y se centrifugaron a la misma velocidad y tiempo. Posteriormente, se lisaron las células con 60 μ L de tampón WCE 300 (HEPES (pH 7.7) 25 mM, NaCl 0.3 M, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Triton X-100 0.1%, β -glicerofosfato 20 mM, ortovanadato sódico 0.1 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 2 mM, aprotinina 20 μ g/mL y leupeptina 20 μ g/mL). Tras agitación vigorosa, se incubó en hielo durante 20 min. A continuación, los lisados se centrifugaron a una velocidad de 13000 rpm durante 20 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante (en esta fracción se encuentran las proteínas solubilizadas). La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford (método colorimétrico basado en la reacción del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a proteínas), mediante el Kit Protein Assay de BioRad (Richmond, CA, EE.UU). La cantidad de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas por espectrofotometría a partir de una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA (Albúmina sérica bovina, Sigma®). Se tomaron 35-50 μ g de proteínas totales mezclados con 10 μ L de tampón de carga Laemmli (SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 140 mM, Tris-HCl pH 6.8 60 mM, azul de bromofenol 0.01%) y se sometieron a desnaturalización por calor (95°C durante 5 min). Seguidamente, las muestras se cargaron en geles de poli(acrilamida) (concentración de poli(acrilamida) en base al peso molecular de la proteína a estudiar) con SDS (dodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE), y se realizó la electroforesis correspondiente. Una vez realizada la separación de las proteínas en base a su peso molecular, se realizó la transferencia

de las mismas mediante transferencia húmeda a membranas de PVDF (Millipore®) y membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom), utilizando tampón de transferencia húmeda (Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%). Después de transferir las proteínas a la membrana, se realizó un lavado de la misma con tampón TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%). Para determinar si la transferencia se había llevado a cabo satisfactoriamente, se tiñeron las membranas con una solución de Rojo Ponceau 0.1% en ácido acético (Sigma®). La eliminación de la tinción de la membrana se consiguió con sucesivos lavados con TBST y agitación. A continuación, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBST durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C y agitación, con el correspondiente anticuerpo primario disuelto en una solución de TBST, y leche desnatada o BSA al 2%, dependiendo de las condiciones sugeridas por el fabricante los anticuerpos primarios empleados se muestra en la **Tabla Nº 6**. Tras tres lavados de 5 min con TBST y agitación, se procedió a la incubación de los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, se procedió al mismo proceso de lavado de las membranas mencionado anteriormente. Finalmente, se realizó el revelado de las membranas por quimioluminiscencia. Se incubaron las membranas durante 1 min con el sustrato de ECL (*enhanced chemiluminescence*, Amersham Biosciences) de inmunodetección en filtro y se revelaron en películas de rayos X. El peso molecular de las proteínas en estudio se determinó utilizando patrones estándar de peso molecular conocido (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad®).

Algunas de las membranas se sometieron al proceso conocido como *stripping*, para retirar los anticuerpos unidos previamente a las proteínas de la membrana y ser reutilizada para la identificación de otras proteínas. Para llevar a cabo este proceso de separación, se incubaron las membranas con la correspondiente solución de *stripping* (β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.2) durante 20 min a 50°C y agitación. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBST, se procedió a bloquear nuevamente la membrana con leche desnatada, continuando con el proceso descrito anteriormente.

2.7 INHIBICIÓN DE LA FAMILIA DE CASPASAS

Se cultivaron 5×10^5 células en placas de 6 pocillos. Posteriormente, las células se trataron con el inhibidor de caspasa correspondiente (**Tabla Nº 7**) durante 1 h. A continuación, las células se trataron con EDFL a la concentración determinada para cada una de las líneas celulares durante 24 h. Las células se trataron con tripsina 0.05% y se lavaron con PBS 1X Na^+/K^+ , se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se les retiró el sobrenadante. Seguidamente, las células se fijaron con etanol al 70% toda la noche. Al día siguiente, las muestras se marcaron con IP y analizaron para ciclo celular mediante citometría de flujo, tal

como se describió en el apartado de análisis de fragmentación de ADN mediante citometría de flujo.

Tabla No 7: Inhibidores de caspasas empleados en cultivo celular: Se detalla el nombre del inhibidor, la concentración empleada, el sustrato que inhibe y la compañía que lo produce. Estos inhibidores se encuentran disueltos en DMSO, por lo que la concentración de uso para ciclo celular no debe exceder una concentración de 0.1% para evitar la toxicidad de la célula.

Inhibidor	Concentración	Sustrato	Proveedor
z-VAD-fmk	50 μ M	Inhibidor general de caspasas	Calbiochem®
Ac-DEVD-CHO	50 μ M	Caspasa-3	Calbiochem®
z-LE(OMe)HD(OMe)-fmk	50 μ M	Caspasa-9	Calbiochem®
z-LEVD-fmk	5 μ M	Caspasa-4	Enzo®LifeSciences

2.8 ENSAYO DE ACTIVIDAD JNK QUINASA

La quinasa JNK fosforila dos residuos de serina (Ser-63 y Ser-73) en el dominio N-terminal del factor de transcripción c-Jun. Este experimento se realizó utilizando como sustrato de JNK una proteína de fusión Glutathion-S-Transferasa (GST) con los 223 primeros aminoácidos del factor de transcripción c-Jun (c-Jun-1-223). Este procedimiento se ha realizado tal como se ha descrito previamente en (Gajate et al, 1998).

2.8.1 Expresión de la proteína de fusión y purificación mediante cromatografía de afinidad

Las bacterias *E. coli* previamente transformadas con el plásmido pGEX-2T-c-Jun-1-223, se crecieron en 250 mL de medio Luria-Bertani (LB) (0.5% extracto levadura, 1% NaCl, 1% triptona) con 100 μ g/mL de ampicilina en agitación constante a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica $DO_{600} = 0,9$.

La expresión de proteínas por el vector pGEX se encuentra bajo el control del promotor *lac*, el cual, puede inducirse químicamente utilizando el análogo de la lactosa isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG). La expresión de la proteína de fusión GST-c-Jun-1-223 se indujo a gran escala adicionando 0.1 mM de IPTG al caldo de cultivo; transcurridas 5 h, las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min a 4°C (rotor JA-14, centrífuga Avanti™ LE-80K, Beckman® Instruments, Palo Alto, CA, EE.UU). El sedimento bacteriano obtenido, se resuspendió en 5 mL de PBS 1X Na^+/K^+ frío, suplementado con PMSF 0.5 mM, aprotinina 1 μ g/mL, leupeptina 1 μ g/mL y EDTA 0.1 mM. Posteriormente, se sometió a 4 ciclos de ultrasonido de 30 seg cada uno. Al lisado bacteriano obtenido, se le adicionaron 0.5 mL de Triton X-100 al 10%, y tras una breve agitación, se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con 200 μ L de una suspensión de bolas de glutatión-agarosa

(Sigma®), y se incubó entre 1 a 2 h a 4°C en rotación constante. Finalmente, las bolas se sedimentaron por centrifugación (7000 rpm durante 10 min) y se lavaron tres veces con una solución de Triton X-100 0.1% en PBS frío, previamente equilibradas con tampón de dilución (HEPES 20 mM pH 7.7, EDTA 0.1 mM, MgCl₂ 2.5 mM, Triton X-100 0.05%, β-glicerofosfato 20 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, PMSF 0.5 mM, aprotinina 1 μg/mL, leupeptina 1 μg/mL). Posteriormente, las bolas de agarosa-GST-c-Jun-1-223 se resuspendieron en 25 μL de esta misma solución.

2.8.2 Ensayo quinasa

Se incubaron entre 3 - 5 x 10⁶ células durante 30 min a 4°C en agitación, con 200 μL de tampón de extracción (HEPES 25 mM pH 7.7, NaCl 0.3 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Triton X-100 0.1%, β-glicerofosfato 20 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, PMSF 0.5 mM, aprotinina 1 μg/mL, leupeptina 1 μg/mL). A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, se tomó el sobrenadante y se diluyó con 600 μL de tampón de dilución. Seguidamente, se mantuvieron a 4°C durante 10 min y se centrifugaron nuevamente a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. A continuación, los extractos obtenidos se mezclaron con los 25 μL de la suspensión de bolas de agarosa-GST-c-Jun-1-223 en tampón de dilución. Esta suspensión se mantuvo en rotación constante a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se sometieron a cuatro ciclos de centrifugación de 12000 rpm durante 10 min y entre cada ciclo de centrifugación se lavaron con 1 mL de tampón de dilución suplementado con NaCl 50 mM. A continuación, las bolas se resuspendieron en 30 μL de tampón quinasa (HEPES 20mM pH 7.7, DTT 2 mM, β-glicerofosfato 20 mM, MgCl₂ 20 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, ATP 20 μM), y se incubaron con 4 μCi de [γ-³²P]- ATP a 30°C durante 20 min. Luego, se procedió al lavado de las bolas ya marcadas con tampón de dilución suplementado con NaCl 50 mM. Se resuspendieron y se calentaron hasta ebullición en 10 μL de tampón Laemmli 5 veces más concentrado. Finalmente, las muestras se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% y se realizó la transferencia húmeda en membranas de celulosa. La proteína c-Jun-1-223 fosforilada, se visualizó mediante quimioluminiscencia y autoradiografía.

2.9 INHIBICIÓN DE PROTEÍNAS DE LA RUTA DE LAS MAPKs Y PI3K/AKT

Se cultivaron 2.5 x 10⁵ células en placas de 6 pocillos. Se trataron con el inhibidor específico de cada una de las diferentes rutas a su respectiva concentración (**Tabla No 8**). Tras 1 h de tratamiento con el inhibidor, las células se trataron con EDLF a la concentración específica para cada línea celular durante 24 h. Se recogieron las células por tratamiento con tripsina 0.05% y centrifugación a 1200 rpm durante 5 min y se fijaron con etanol al 70%. Al día

siguiente se cuantificó el porcentaje de apoptosis, según el procedimiento de análisis de fragmentación de ADN mediante citometría de flujo.

Tabla No 8: Inhibidores de las rutas de señalización MAPKs y PI3K/Akt empleadas: En esta tabla se indica el nombre del inhibidor, la concentración empleada para ensayos *in vitro*, el sustrato específico sobre el que actúan y la casa comercial que lo produce.

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN	SUSTRATO	PROVEEDOR
SP600125	20 μ M	JNK (3 Isoformas)	Calbiochem®
LY294002	20 μ M	PI3K (3 Isoformas)	Calbiochem®
U0126	10 μ M	MEK (1/2)	Calbiochem®
Akt Inhibidor III	20 μ M	Akt	Calbiochem®
Akt Inhibidor X	20 μ M	Akt	Calbiochem®
Wortmanina	500 nM	PI3K (3 Isoformas)	Sigma®
Cloroquina	30 μ M	Inhibe acidificación lisosomal	Sigma®

2.10 LOCALIZACIÓN DE EDLF EN RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El análisis de la localización de un análogo fluorescente de EDLF en el retículo endoplasmático (RE) en las diferentes líneas celulares se realizó mediante transfección transitoria con un plásmido que codifica para una versión de la proteína de fluorescencia roja RFP (*red fluorescence protein*) que colocalizaba con el marcador de retículo endoplasmático calreticulina (reRFP) (plásmido cedido por el Dr. F.X. Pimentel-Muñoz, IBMCC, CSIC-USAL) (Klee & Pimentel-Muñoz, 2005). Se cultivaron 5×10^5 células en placas de 6 pocillos. Para el caso de células adherentes, se colocaron láminas de vidrio estériles cubiertas con una solución de poli-L-lisina al 10%, previo al cultivo de las células. Posteriormente, las células se transfectaron con 4 μ g de la construcción reRFP empleando el reactivo de transfección Lipofectamine® (Invitrogen®), en ausencia de suero fetal bovino. Tras 4 h de incubación, se les añadió a las células suero fetal bovino al 4% y se dejaron las placas en incubación durante 24 h. Tras la transfección de las células, se cambió nuevamente a medio suplementado y las células se incubaron durante una 1 h con el análogo fluorescente de EDLF 1-O-[11'-(6''-etil-1'',3'',5'',7''-tetrametil-4'',4''-difloro-4''-bora-3a'',4a''-diazas-indacen-2''il)undecil]-2-O-metil-rac-glicero-3 fosfocolina (Et-BDP-ET) a una concentración de 10 μ M. Tras el tratamiento, se retiró el medio de cultivo de las células y se fijaron con una solución de formaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS, finalmente las muestras se montaron en medio acuoso con la solución comercial anti-desvanecimiento SlowFade Light® Antifade Kit (Molecular Probes). La colocalización de los fluorocromos se analizó usando un microscopio confocal de escaneo por láser (Microscopio Zeiss LSM 510).

2.11 CO-LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE MEMBRANA FAS/CD95 EN MICRODOMINIOS DE MEMBRANA RAFTS

Inicialmente, se trataron las líneas celulares de SE (1×10^6 células/pocillo) con EDLF a diferentes tiempos (3, 6, 9 h de tratamiento), se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1600 rpm durante 9 min. Las células se resuspendieron en 100 μ L de PBS, de los cuales se tomaron 50 μ L para ser extendidos en una placa portaobjetos cubierta con poli-L-lisina. Se dejó evaporar el PBS y a continuación se fijaron las células con formaldehído al 4%. Posteriormente, se incubaron las células con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fas/CD95 (Anti-human Fas/CD95 SM 1/23 monoclonal mouse antibody, Bender Medsystems®, Vienna, Austria) en PBS durante una 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Cy3-conjugated sheep anti-mouse antibody (Jackson Immunoresearch, Westo Grovw, PA, EE.UU) a una dilución 1:150 en PBS durante 1 h. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se incubaron con la subunidad B de la toxina colérica (interacciona con gangliósido GM1, utilizado como marcador de los microdominios de membrana *rafts*) unida a FITC verde (FITC-CTxB subunit, Sigma®) a 8 mg/mL. Tras un lavado con PBS, las muestras se montaron en medio acuoso con la solución antidesvanecimiento para preservar la fluorescencia SlowFade Light® Antifade Kit (Molecular Probes). La colocalización de los fluorocromos se realizó en el microscopio confocal Zeiss LSM 510.

2.12 ANÁLISIS DEL CALCIO CITOPASMÁTICO POR MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA (FLUO-4)

Se tomaron 3×10^5 células en placas de 6 pocillos, y se trataron con EDLF a una concentración de 10 μ M durante 1 h. Posteriormente, se marcaron las células con la sonda Fluo-4 (quelante de calcio) a una concentración 20 nM, se dejó incubar durante 15 min y se captaron imágenes por microscopía de fluorescencia (microscopio invertido de fluorescencia Zeiss 0.5) a una longitud de onda de excitación de 480 nm (Verde). Se marcaron las células sin tratar como las tratadas con EDLF. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo.

2.13 ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C MITOCONDRIAL

Para analizar la liberación de citocromo c desde la mitocondria se utilizaron diferentes tampones de lisis para obtener las fracciones mitocondriales (*FM*) y citosólicas (*FC*) (Gajate et al, 2012).

Se trataron 3×10^6 células de SE y CCC con EDLF a la concentración indicada a diferentes tiempos (3, 6, 9, 15, 24 h). Las células se trataron con tripsina 0.05% y centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, y se lavaron con 1 mL de PBS a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron las células a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 50 μ L de tampón de lisis (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, digitonina 0.05%, Tris 25 mM pH 6.8, DTT 1 mM, aprotinina y leupeptina 1 μ g/mL, PMSF 0.1 mM), se incubó durante 30 seg a 4°C, y a continuación se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Se separó el sobrenadante obteniendo la fracción citosólica (*FC*) y el pellet correspondía a la fracción mitocondrial y nuclear (*FMN*). La *FMN* se resuspendió rápidamente con 50 μ L de tampón de lisis y posteriormente se realizó una microcentrifugación (*spin*) con el fin de precipitar los núcleos. El sobrenadante corresponde a la pre-fracción mitocondrial (*PFM*). La *PFM* obtenida, se le realizó otra microcentrifugación corta de 10 segundos para precipitar los núcleos restantes, obteniendo la fracción mitocondrial (*FM*). La *FM* se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min a 4°C para precipitar las mitocondrias, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 μ L de tampón de lisis.

Los extractos citosólicos obtenidos, se cuantificaron por reactivo Bradford y se realizó el correspondiente Western blot para la identificación del citocromo c liberado al citosol.

2.14 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y DE LA VARIACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se trataron 2.5×10^5 células de las líneas celulares de SE y CCC con EDLF a la concentración indicada a diferentes tiempos (3, 6, 9, 15 y 24 h). Posteriormente, las células se trataron con tripsina 0.05%, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. A continuación, las células se resuspendieron e incubaron con una solución de Ioduro de 3,3' diexiloxocarbocianina 20 nM (DiOC₆ (3); fluorescencia verde; Molecular Probes®, Leiden, The Netherlands) y 2 mM dihidroetidina (DHE; fluorescencia roja por oxidación; Sigma®) en PBS durante 40 min a 37°C y agitación. Se realizó el análisis de la fluorescencia en células vivas mediante citometría de flujo (Gajate et al, 2000b; Reis-Sobreiro et al, 2009).

2.15 INHIBICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POR TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES LIPÍDICOS Y EFECTO EN LA APOPTOSIS

Se trataron 2.5×10^5 células de las líneas celulares de SE y CCC durante 1 h con el antioxidante liposoluble BHA (butilhidroxianisol disuelto en etanol) a una concentración de 50 μM . Posteriormente, se trataron las células con EDLF a la concentración indicada a diferentes tiempos (3, 6, 9, 15 y 24 h). A continuación, las células se trataron con tripsina 0.05%, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Posteriormente las células se fijaron con etanol al 70% a 4° toda la noche. Al día siguiente, las células se marcaron con IP para el análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo.

2.16 ESTUDIO DE INCORPORACIÓN DE EDLF MARCADA CON TRITIO ($[^3\text{H}]$ -EDLF)

Se trataron 3×10^5 células con 0.05 mCi $[^3\text{H}]$ -EDLF a 10 μM durante 1 h. A continuación, se recogieron las células y se centrifugaron a 1600 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se realizaron tres lavados consecutivos con una solución de PBS con BSA al 1%. Luego, se añadió a las células una solución de 0.1% de Triton X-100 para lisarlas y cuantificar la cantidad de $[^3\text{H}]$ -EDLF incorporada a la célula tras una hora de tratamiento. Seguidamente, a este lisado se le añadió 1 mL de líquido de centelleo soluble en agua. La cuantificación de la $[^3\text{H}]$ -EDLF incorporada se realizó en un contador de radiaciones beta. La $[^3\text{H}]$ -EDLF fue sintetizada por trititación de un derivado de EDLF 9-octadecenílico (Amersham Buchler, Braunschweig, Alemania)(Mollinedo et al, 1997).

2.17 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR FAS/CD95 EN LA SUPERFICIE CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Se incubaron 4×10^5 células con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fas/CD95 (Anti-human Fas/CD95 SM 1/23 monoclonal mouse antibody, Bender Medsystems®, Vienna, Austria) a 500 ng/mL en PBS por una 1 h a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS a 4°C y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron e incubaron durante 1 h a 4°C con una solución del anticuerpo secundario unido a isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated goat antimouse immunoglobulin (Dakopatts, Glostrup, Denmark). Después de un lavado con PBS y centrifugación (1200 rpm durante 10 min), las células se fijaron con formaldehído al 1,5% durante 24 h. El análisis de las muestras se realizó por cuantificación de la inmunofluorescencia mediante citometría de flujo. El porcentaje de células positivas para Fas/CD95 se estimó usando el sobrenadante de mieloma P3X63 como control negativo (Gajate et al, 2000a).

2.18 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* DE EDLF EN MODELO DE XENOTRANSPLANTE

El estudio de la actividad antitumoral *in vivo* de EDLF se realizó en ratones hembras inmunodeficientes (CB-17-*severe combined immunodeficient mice* SCID, Charles River Laboratories, Lyon, Francia) de 8 semanas de edad. Se mantuvieron de acuerdo a normas institucionales (12 h/12 h de ciclos luz/oscuridad a una temperatura de 22°C, recibiendo una dieta estándar y agua acidificada *ad libitum*), cumpliendo con la legislación española (Real Decreto 53 de 2013). A los animales se les inyectó en el flanco derecho del lomo, por vía subcutánea, 5×10^6 células de la línea celular CADO ES-1 (suspendidas en 100 μ L de PBS y 100 μ L de Matrigel® (*Basement membrane matrix*, BD®, Franklin Lakes, NJ, EE.UU)). Una vez los tumores se hacían palpables (tras dos semanas de implantación aproximadamente), se asignaron los ratones aleatoriamente en tres grupos (7 ratones por grupo): **Grupo control:** animales a los que se les administró únicamente el vehículo (agua); **Grupo EDLF (1):** animales que se les administró una dosis de 30 mg/kg/día de edelfosina (EDLF); y **Grupo EDLF (2):** animales que se les administró una dosis de 40 mg/kg/día de EDLF. Posteriormente, se les administró por vía oral, la dosis diaria indicada de EDLF. Se controló el peso de cada ratón y el volumen del tumor con un calibrador digital (cada tres días). El volumen del tumor se calculó a través de la siguiente fórmula: diámetro largo x (diámetro corto)² x 0.5.

Se trataron los animales durante 21 días, ya que los tumores de los animales sin tratamiento presentaban un diámetro de tumor de 3 cm aproximadamente (diámetro máximo permitido para este tipo de estudios). Tras 24 h de la última administración del tratamiento, los animales se sacrificaron por dislocación cervical de acuerdo a las guías institucionales (Real Decreto 53 de 2013). Los tumores se extrajeron y se pesaron. Del tumor extraído se tomó una parte para el estudio de inmunohistoquímica. Se extrajo sangre para realizar los estudios de biodistribución relativa de EDLF en el tumor (Gajate et al, 2012; Mollinedo et al, 2010).

2.19 CUANTIFICACIÓN DE LA EDLF EN TUMORES EXTRAIDOS DEL ENSAYO *IN VIVO* POR HPLC-MS

En colaboración con el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra, se cuantificó la cantidad de EDLF incorporada en el tumor mediante la técnica de HPLC-MS (cromatografía de alta resolución acoplado a espectrometría de masas), extraído en la necropsia del ensayo *in vivo* de EDLF para SE. También se cuantificó la cantidad de EDLF en plasma sanguíneo.

Para la obtención del plasma, se recogió la sangre en tubos con EDTA para evitar la coagulación. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 4100 rpm durante 15 min a 4°C, y se recogieron 100 μ L de plasma aproximadamente. A los diferentes tumores se les añadió 1

mL de agua (pH 7.4) y se sometieron a homogeneización vigorosa a través de un homogeneizador de miniperlas (BioSpect Products, Inc, Bartlesville, OK, EE.UU). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 9000 rpm durante 10 min y se tomó el sobrenadante. Tanto el plasma como el sobrenadante del tumor se recogieron y almacenaron a -80°C.

Para cuantificar la EDLF presente en las muestras de tumor y plasma por HPLC-MS, se empleó como patrón interno el factor de agregación plaquetaria (PAF) (1 mg/mL). Se añadieron 10 µL del patrón interno a 100 µL de la muestra a cuantificar y se completó hasta un volumen de 200 µL con una solución de ácido fórmico al 1% en metanol (para precipitar las proteínas presentes en la muestra). Las muestras se agitaron en vortex durante 1 min y a continuación se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Se tomaron 25 µL del sobrenadante para analizar por HPLC-MS.

Para la determinación cuantitativa de EDLF, se usó el equipo de HPLC-MS Model 1100 Series LC con detector de presión atmosférica por electrospray (HP 1100 con MSD VL, Waldbronn, Germany). La separación se llevó a cabo a 50°C en fase reversa, en una columna de 150 mm x 3 mm Gemini, empacada con C18n (partículas de sílica de fase reversa de 5 µm (Phenomenex®, Torrance, CA, EE.UU)). Se empleó como fase móvil, una mezcla de metanol-ácido fórmico al 1% (en proporción 95:5), bombeada a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La detección de EDLF y el patrón interno, se realizó por ionización selectiva en modo positivo en un índice de m/z de 524.40 para EDLF y un índice de m/z de 574.40 para el patrón estándar (PAF). Bajo estas condiciones, la EDLF y el patrón interno presentaron un tiempo de retención de 3.65 y 3.50 min respectivamente. La cantidad de EDLF presente en la muestra, se obtuvo mediante la proporción entre el área bajo los picos de retención de EDLF de la muestra y el patrón interno mediante una curva de regresión determinada, tanto para el plasma como para los tumores. La respuesta en el rango lineal de esta técnica fue de 5-250 ng para las muestras de plasma y 5-685 ng para las muestras de tumor. Las concentraciones de EDLF (µg/mL y µg/g) se calcularon dividiendo la cantidad de EDLF medida entre el volumen de plasma o entre el peso del tumor empleado para el análisis.

2.20 INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS TUMORES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS *IN VIVO*

Este experimento se realizó con el objetivo de observar la detección de determinados marcadores de apoptosis, proliferación y estrés de RE en los tumores extraídos del estudio *in vivo*.

Inicialmente la muestra de tumor extraída en el momento de la autopsia se fijó con una solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche. A continuación, se realizó la correspondiente deshidratación del tejido en concentraciones crecientes de etanol (etanol al

50% (15 min), etanol al 70% (30 min), etanol al 80% (30 min), etanol al 90% (30 min), etanol al 96% (2 x 1 h), etanol absoluto (3 x 30 min) y tolueno (2 x 15 min)). Una vez deshidratado, el tejido se incluyó en parafina toda la noche a 60°C. Al día siguiente, se realizaron dos cambios de parafina (2 x 2 h). Posteriormente, se realizaron secciones del tejido de 5 µm de espesor en micrótomos, que se recogieron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Seguidamente, se procedió a la desparafinación de las secciones de tejido. Para ello, se pasaron las muestras por xilol y por concentraciones decrecientes de etanol (xilol, etanol absoluto, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% y agua).

Con el fin de inactivar las peroxidasas endógenas, las secciones de tejido se trataron con H₂O₂ al 3% a 27 °C durante 15 min. Posteriormente, las muestras se incubaron con una solución de BSA al 0.3% y Triton X-100 al 0.5% en PBS durante 6 min. A continuación, se incubaron las secciones con una solución de BSA al 3% en PBS durante 30 min. Por último, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-caspasa-3 (Cell Signaling Technology®)(1:100), anti-GADD153 (Cell Signaling Technology®) (1:100) y anti-Ki-67 (Cell Signaling Technology®) (1:100). Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces con PBS (5 min cada lavado), después con una solución de PBS-Tween® 0.1%, para luego incubar el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (1:500) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron nuevamente lavados con una solución de PBS-Tween® 0.1%. Luego, los cortes se incubaron con estreptavidina unida a peroxidasa (Vector Laboratories) durante 60 min en cámara húmeda. Para el revelado se utilizó una mezcla tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.03% y H₂O₂ al 0.0033% en PBS-Tween® 0.1%. La peroxidasa reduce el H₂O₂ y hace que se oxide el DAB originando un producto insoluble de color marrón. Finalmente, las secciones se deshidrataron en una batería de alcoholes de gradación creciente y xilol (5 min en cada paso), y se montaron con Entellan (Merck®). El marcaje se analizó en el microscopio Nikon Elipse 400® y se empleó para la obtención y tratamiento de las imágenes el software de análisis Metamorph® (Molecular Devices Corporation).

Para observar los cambios en el núcleo y citoplasma, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Tras la desparafinación e hidratación de los cortes descrita anteriormente, se realizó la tinción con una solución de hematoxilina durante 3 min. A continuación, se realizó el lavado de las muestras (dos lavados de 10 min con agua destilada). Seguidamente, se realizó la tinción con eosina durante 30 seg y se realizó un último lavado con agua destilada durante 10 min. Una vez las muestras se han teñido, se realizó nuevamente el proceso de deshidratación en el gradiente de etanol a xilol descrito anteriormente y se montaron las muestras para la obtención de las imágenes.

2.21 AISLAMIENTO DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA “RAFTS”

Se procedió al aislamiento y separación de los microdominios de membrana *rafts* mediante lisis celular en detergente no iónico y posterior centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (Gajate & Mollinedo, 2001)

Se trataron las células (8×10^7 células) de la línea CADO ES-1 con EDLF a $10 \mu\text{M}$ durante varios tiempos (3, 6, 9, y 12 h). Las células se recogieron, centrifugaron (1200 rpm durante 9 min) y lavaron con PBS a 4°C . A continuación, se lisaron las células con Tritón X-100 en tampón TNEV (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Na_3VO_4 1 mM) con los respectivos inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ y leupeptina $1 \mu\text{g}/\text{mL}$). Los lisados celulares se homogeneizaron en un homogeneizador manual de tejidos tipo Potter-Elvehjem (10 pases por el homogeneizador). Para retirar los núcleos y restos celulares, se centrifugó el homogeneizado a 1000 rpm durante 8 min y se recogió el sobrenadante. Posteriormente, se tomó un 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 1 mL de una solución de sacarosa al 85% en tampón TNEV. A continuación, esta solución se transfirió a un tubo de ultracentrifuga Beckman de 14 x 95 mm (Beckman Instruments). Seguidamente, se preparó el gradiente de sacarosa en el siguiente orden: 6 mL de sacarosa al 35% y 3.5 mL de sacarosa al 5% en tampón TNEV. Se centrifugaron las muestras (Ultracentrifuga Beckman Optima LE-80K-Beckman Instruments) con un rotor SW40 a 38000 rpm durante 18 h a 4°C . El proceso de centrifugación se detuvo en ausencia de freno para evitar la distorsión del gradiente formado. Finalmente, se recogieron fracciones de 1 mL comenzando desde la parte superior del tubo (Fracción 1) hasta el fondo del mismo (Fracción 12) y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Para determinar la localización de Fas/CD95 y los dominios de membrana *raft*, se tomaron 20 μL de cada una de las fracciones obtenidas del gradiente discontinuo de sacarosa y se analizaron mediante la técnica de Western blot, tal como se describió en el apartado correspondiente a esta técnica. La detección de dominios de membrana *raft* se realizó monitoreando la localización del gangliosido GM1 con la subunidad B de la toxina colérica conjugada a peroxidasa (Sigma®) y el sistema ECL descrito anteriormente.

2.22 REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL DE LA MEMBRANA CELULAR

Para reducir la cantidad de colesterol de la membrana celular, se trataron las células (1×10^6 células) con metil- β -ciclodextrina (m- β CD) a una concentración de 10 mg/mL, en medio sin suero durante 1 h. Posteriormente, se retiró el medio que contenía m- β CD y se realizaron tres lavados con PBS. A continuación, se colocó nuevamente medio con suero y se trataron las células con EDLF (concentración definida para cada línea celular) durante 24 h y se fijaron con etanol al 70%. Seguidamente, se analizaron las muestras mediante el estudio del ciclo celular por citometría de flujo.

2.23 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR:

2.23.1 Incorporación de Ioduro de Propidio:

Se analizó la incorporación de IP en células vivas con el fin de verificar la integridad de la membrana durante el proceso de muerte.

Se cultivaron 2.5×10^5 células/mL en placas de 6 pocillos. Las células se trataron con EDLF a la concentración indicada para cada línea celular a diferentes tiempos de tratamiento (3, 6, 9, 15 y 24 h). A continuación, las células se recogieron y centrifugaron a 1600 rpm durante 10 min, se resuspendieron en una solución de IP de 1 mg/mL en PBS y se incubaron entre 5 y 10 min. Posteriormente, se analizaron las muestras observando los cambios en la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo que indica la cantidad de IP incorporado en la célula.

2.23.2 Tinción con Trypan Blue

Se cultivaron y trataron las células con EDLF de la misma manera que en el apartado anterior. Se recogieron las células, se centrifugaron a 1600 rpm durante 10 min, se retiró el medio y a continuación se resuspendieron en 1 mL de PBS. Posteriormente, se tomaron 50 μ L de la suspensión celular y se diluyeron con 50 μ L de *trypan blue* 0.4% (Sigma®). Una vez marcadas las células, se tomó una alícuota de 10 μ L de la suspensión celular y se colocó en una cámara de Neubauer. Las células que no son viables se tiñeron de azul al incorporar el colorante, mientras que las células viables no se tiñeron y permanecían refringentes a la luz. Se contó el número de células vivas y muertas en cada uno de los cuadrantes y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el porcentaje de células vivas y muertas.

RESULTADOS

SARCOMA DE EWING

1. CITOTOXICIDAD DE ATLS EN LÍNEAS CELULARES DE SARCOMA DE EWING

Se analizó la actividad de diferentes lípidos antitumorales (ATLs) con relevancia preclínica y/o clínica: edelfosina (EDLF), perifosina (PERIF), miltefosina (MILTEF) y erucilfosfocolina (ERPC), sobre dos líneas celulares de SE (CADO-ES 1 y RDES), para determinar cuál de estos compuestos presentaban mayor actividad citotóxica, y posteriormente profundizar en su mecanismo de acción (**Figura N°16, A**).

Para determinar la actividad citotóxica de los ATLs se realizó el análisis de la degradación de ADN mediante citometría de flujo. De todos los ATLs evaluados, la edelfosina (EDLF) resultó ser el agente con mayor actividad apoptótica, con un porcentaje cercano al 40% en ambas líneas celulares a las 24 h de tratamiento, porcentaje que se incrementa con el tiempo de incubación. El segundo compuesto con mayor actividad fue la perifosina (PERIF), con un porcentaje de apoptosis próximo al 20% a las 24 h en la línea celular CADO-ES 1 y menor para la línea RDES (10% a las 24 h) (**Figura N°16, A**). Los compuestos miltefosina (MILTEF) y erucilfosfocolina (ERPC) apenas muestran actividad a las 24 h (menor de 10% de apoptosis en las dos líneas celulares) y solo se empieza a observar una apoptosis significativa a las 72 h de tratamiento (cercana al 30% en las dos líneas celulares) (**Figura N°16, A**). De forma paralela, se analizó la toxicidad de un análogo estructural inactivo de EDLF, ET18OH (1-*O*-octadecil-*rac*-glycero-3-fosfocolina)(Gajate et al, 1998; Mollinedo et al, 1997), en estas líneas celulares. En la **Figura N°16, B**, se observa que este análogo no presenta toxicidad alguna en las líneas celulares de SE, lo que sugiere que la actividad antitumoral detectada es dependiente de la estructura química específica de EDLF.

2. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR E INICIO DE LA APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES DE SARCOMA DE EWING TRAS EL TRATAMIENTO CON EDLF

El análisis temporal del ciclo celular en presencia de EDLF se realizó con el propósito de determinar a partir de qué momento se inicia la muerte de las células en las líneas celulares CADO-ES 1 y RDES. De forma paralela, se evaluó el efecto de EDLF sobre las diferentes fases del ciclo en estas líneas celulares. La concentración de EDLF empleada fue 10 μ M, ya que fue la concentración más baja con actividad citotóxica significativa encontrada para las dos líneas celulares, y está en el rango de concentración efectiva (10-20 μ M) encontrada en plasma en ensayos *in vivo* y de distribución tisular (Estella-Hermoso de Mendoza et al, 2009; Mollinedo et al, 2010a; Mollinedo et al, 2010b).

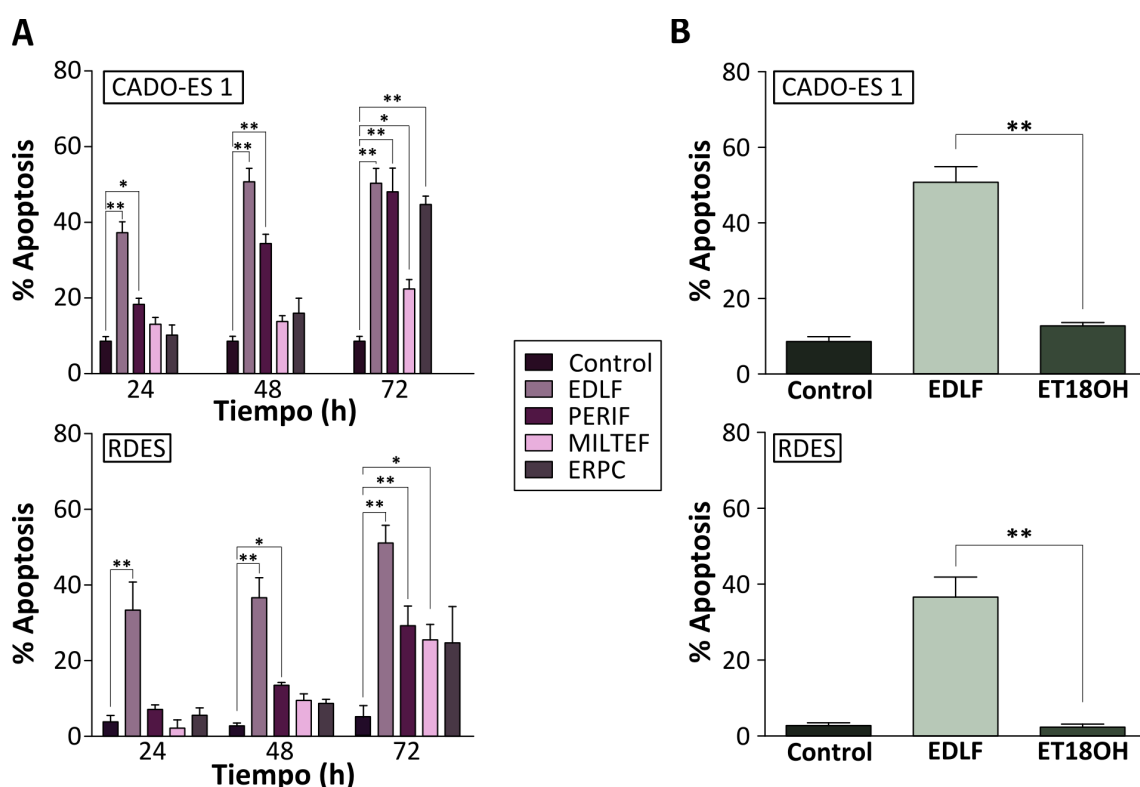


Figura Nº 16: Estudio de la actividad apoptótica de ATLS en líneas celulares de SE: El porcentaje de apoptosis se determinó a través de la cuantificación de células en la fase sub- G_1 del ciclo celular, analizado mediante citometría de flujo. **A.** Se realizó un estudio comparado de los cuatro ATLS (EDLF, PERIF, MILTEF y ERPC) a una concentración de $10 \mu\text{M}$ en las dos líneas celulares de SE. Los datos de apoptosis se compararon con respecto a las células control. **B.** Estudio comparativo de la actividad apoptótica de los ATLS con respecto al análogo inactivo de EDLF (ET18OH) a una concentración de $10 \mu\text{M}$ durante 24 h de tratamiento. Los porcentajes de apoptosis del ET18OH se compararon con respecto a los porcentajes de apoptosis de las células tratadas con EDLF. Los porcentajes de apoptosis son promedio de tres experimentos diferentes \pm E.S. ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

Como se aprecia en la **Figura Nº 17**, se observa un aumento progresivo de la apoptosis (fase sub- G_1) en ambas líneas celulares CADO-ES 1 y RDES, que ya empieza a detectarse a las 9 h de tratamiento con respecto a las células control (**Figura Nº 17**). Este incremento en la población sub- G_1 se acompaña de una disminución en el porcentaje de células en la fase G_0/G_1 (**Figura Nº 17**). Por otro lado, las demás fases del ciclo celular no mostraron variaciones considerables con el tratamiento en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

3. ACTIVACIÓN DE LA MAQUINARIA APOPTÓTICA POR EDLF EN LÍNEAS CELULARES DE SARCOMA DE EWING

Como un indicador adicional de la apoptosis, se estudió la fragmentación internucleosomal del ADN (*DNA laddering*), característica de la muerte por apoptosis. Tras el tratamiento con EDLF, se observó la fragmentación del ADN, para la línea celular RDES, a las 9 h de tratamiento, indicando el tiempo de inicio de la apoptosis (**Figura Nº 18**).

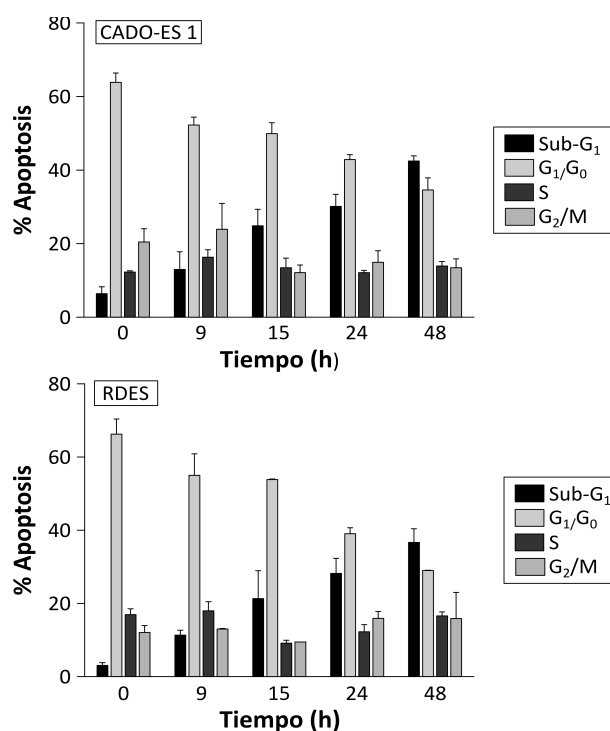


Figura N° 17: Análisis de ciclo celular por efecto de EDLF en líneas celulares de SE: Las líneas celulares se trataron con 10 μ M EDLF a los tiempos correspondientes. El análisis del ciclo celular a los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante el análisis del ciclo por la técnica de citometría de flujo. Los controles corresponden a las células sin tratar. Los porcentajes de células corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm E.S.

Como proteínas fundamentales en el proceso apoptótico, se evaluó además la activación de la caspasa-3 (dando lugar a la forma activa p20) y la fragmentación de PARP (poli(ADP-ribosa) polimerasa), sustrato de caspasa-3 y caspasa-7, en las líneas celulares de SE. Se observó, en ambas líneas celulares, la activación de la caspasa-3 a partir de las 6 h de tratamiento, manteniéndose hasta las 24 h. Esta activación coincide con el tiempo de inicio de la fragmentación de la proteína PARP (**Figura N° 19, A**). Igualmente, se analizó la activación de la caspasa-7, que actúa como caspasa ejecutora junto con la caspasa-3 en el proceso proteolítico. Se observó que la activación de la caspasa-7 coincide con la activación de la caspasa-3 (entre las 6 h y 9 h de tratamiento) (**Figura N° 19, A**). Además, se evaluó la actividad relativa de la caspasa-3 por métodos colorimétricos, encontrándose un aumento en la actividad caspasa a partir de las 3 h de tratamiento, que se incrementa con el tiempo en ambas líneas celulares (**Figura N° 19, B**).

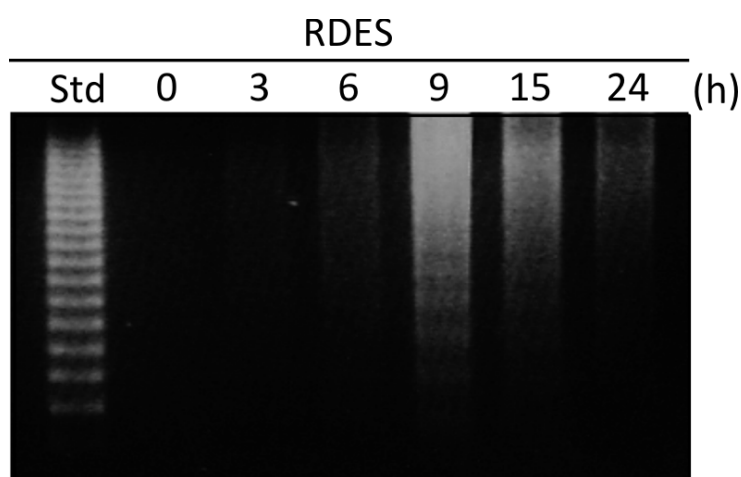


Figura N° 18: Análisis de fragmentación del ADN internucleosomal de la línea RDES por acción de EDLF: Las células se trataron con EDLF (10 μ M) a diferentes tiempos de tratamiento. La visualización de la fragmentación del ADN se realizó por la técnica de *DNA laddering* en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Se empleó como estándar el marcador 123 bp Ladder (Std). Se muestra un resultado representativo de tres experimentos diferentes.

Para comprobar la implicación de las caspasas en el mecanismo de acción de EDLF, se inhibió a toda la familia de caspasas con el uso del agente permeable a las células e inhibidor pan-caspasa z-VAD-fmk (se une irreversiblemente al sitio catalítico de las caspasas inhibiendo la inducción de apoptosis), y de manera específica a la caspasa-3 con el inhibidor Ac-DEVD-CHO (contiene una secuencia de aminoácidos específica del sitio de reconocimiento de caspasa-3 que impide su acción), previamente al tratamiento con EDLF. A continuación, se determinó el porcentaje de apoptosis mediante citometría de flujo. En ambas líneas celulares se observó una reducción significativa en el porcentaje de apoptosis producido por el tratamiento con EDLF, al inhibirse toda la familia de caspasas (**Figura N° 19, C**). Esta disminución en la apoptosis también se observó también al inhibir específicamente la caspasa-3 en ambas líneas, siendo mayor en la línea celular RDES celulares (**Figura N° 19, C**).

4. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN LA ACCIÓN DE EDLF EN SARCOMA DE EWING

Se realizaron estudios de localización celular de EDLF mediante microscopía confocal, utilizando el análogo de EDLF fluorescente Et-BDP-ET y una versión de la proteína de fluorescencia roja RFP que colocalizaba con el marcador de retículo endoplasmático calreticulina (ER-RFP) (Klee & Pimentel-Muinos, 2005). Este compuesto fluorescente se ha empleado anteriormente en nuestro laboratorio como un marcador fiable de la localización subcelular de EDLF (Gajate et al, 2012; Mollinedo et al, 2011). En este estudio se encontró que el análogo Et-BDP-ET se acumulaba en el retículo endoplasmático en células de SE (**Figura N°20**).

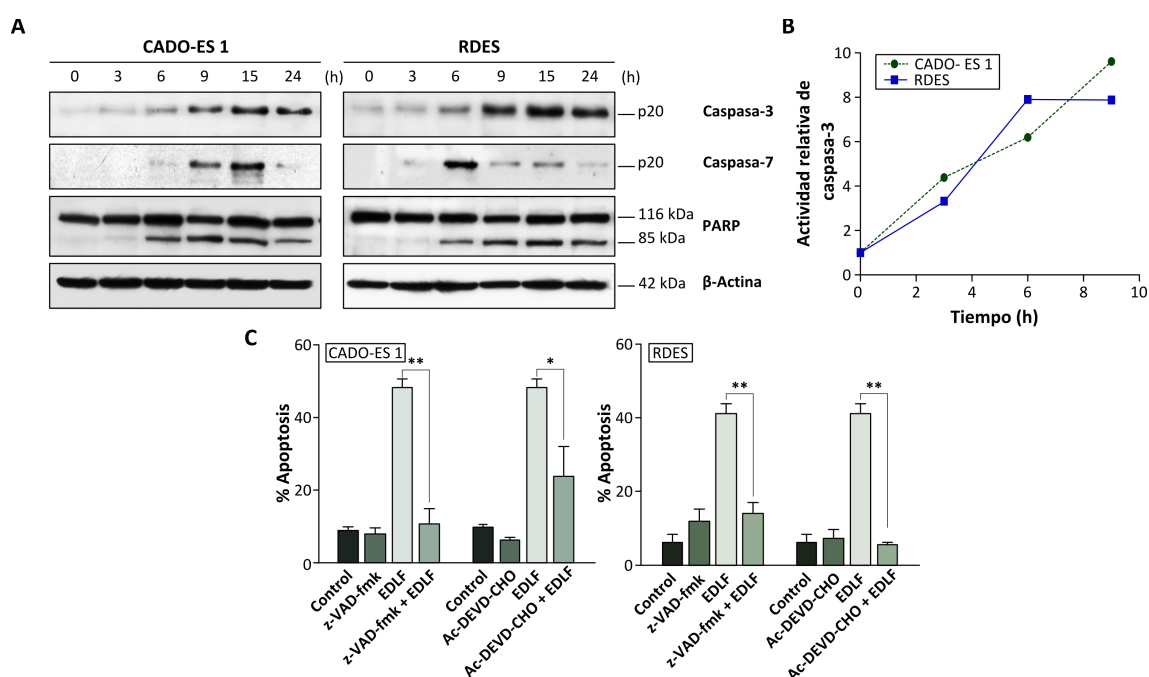


Figura N° 19: Implicación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 en el proceso apoptótico de EDLF en líneas celulares de SE: **A.** El efecto de EDLF sobre estas caspasas se analizó mediante la técnica de WB y marcaje con el correspondiente anticuerpo. Se tomó como referencia de carga la proteína β -actina. **B.** Se evaluó la actividad relativa de caspasa-3 por detección del cromóforo (pNA, p-nitroanilida) a través de la fragmentación del sustrato marcado Ac-DEVD-pNA mediante espectrofotometría. **C.** Las células se incubaron previamente con el inhibidor de la familia de caspasas z-VAD-fmk (50 μ M) y con el inhibidor específico de la caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) (50 μ M). A continuación, las células se trataron con EDLF durante 24 h. El porcentaje de apoptosis se determinó por análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. La significación de la inhibición se realizó por comparación con respecto a las células tratadas únicamente con EDLF. Los resultados aquí descritos representan la media de tres experimentos \pm E.S. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

A continuación se analizó si EDLF inducía estrés de retículo endoplasmático en las células de SE. Mediante *Western-blot*, se observó la inducción de GADD153, marcador de estrés de retículo endoplasmático, a partir de las 6 h de tratamiento con EDLF en las células CADO-ES 1 y RDES (**Figura N°21**). Al estudiar proteínas adicionales implicadas en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*) como eIF2 α (*eukaryotic Initiation Factor 2 α*), se observó su activación tras su fosforilación en las dos líneas celulares a partir de las 3 h de tratamiento con EDLF (**Figura N°21**). Sin embargo, el nivel de expresión de la chaperona GRP78 en la línea celular CADO-ES 1 disminuyó con el tiempo de tratamiento a las 24 h y en la línea RDES a partir de las 15 h (**Figura N°21**). Además, se detectó el fragmento activo (p20) de la caspasa-4 a partir de las 6 h de tratamiento en ambas líneas celulares (**Figura N°21**). Por otra parte, se observó la fragmentación de la proteína del retículo endoplasmático Bap31 a la forma de 20 kDa a partir de las 9 h de tratamiento en ambas líneas celulares (**Figura N°21**). Dado que el fragmento p20 de Bap31 está relacionado con la liberación de calcio del RE y facilita la apertura de la membrana mitocondrial, estos datos sugieren que hay una posible interconexión entre el retículo endoplasmático y la mitocondria en la acción de EDLF en células de SE.

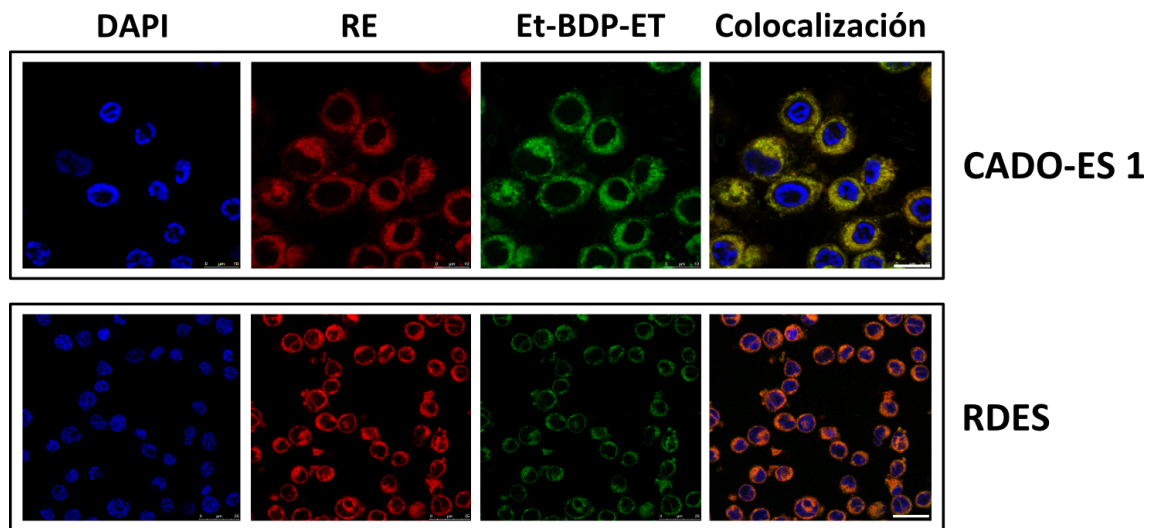


Figura N° 20: Localización del análogo fluorescente de EDLF (Et-BDP-ET) en retículo endoplásmico de líneas celulares de SE: Las dos líneas celulares de SE se transfectaron con el plásmido de la proteína fluorescente roja del RE (fluorescencia roja) y luego se incubaron con el análogo fluorescente de EDLF (Et-BDP-ET)(fluorescencia verde). Los núcleos de las células se marcaron con 4',6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (fluorescencia azul). Las áreas de colocalización entre el RE y Et-BDP-ET en el panel de fusión dan lugar a un color amarillo.

El inhibidor específico de caspasa-4 (z-LEVD-fmk) inhibió (60%) la apoptosis inducida por el tratamiento de EDLF de forma significativa en ambas líneas celulares (**Figura N° 21**). Estos datos en su conjunto indican que EDLF induce un estrés de retículo endoplasmático que parece jugar un papel importante en la inducción de apoptosis en las células de SE.

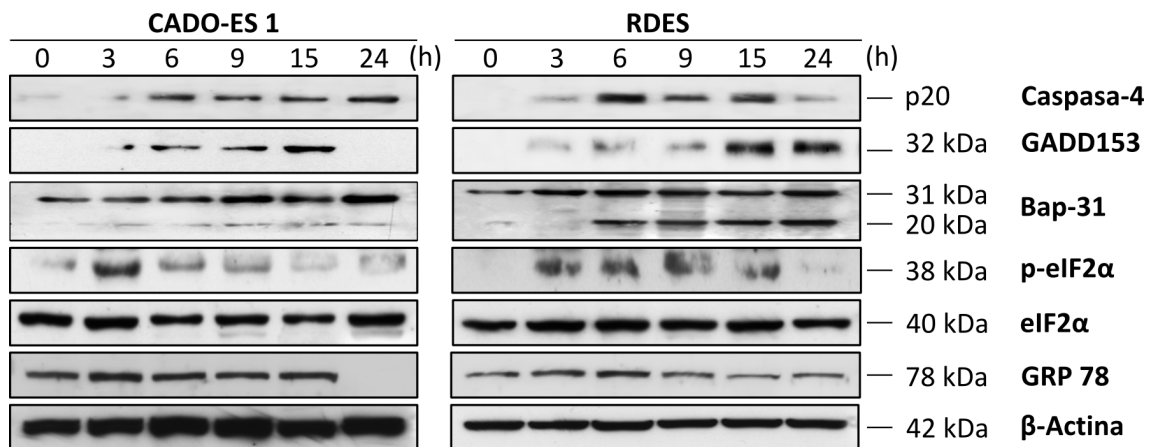


Figura N° 21: Activación de la UPR y de la respuesta apoptótica por estrés de RE en SE: Las dos líneas celulares de SE se trataron con EDLF (10 μ M) en los tiempos indicados. Posteriormente, se analizaron las proteínas indicadas como marcadores de estrés de RE y activación de la UPR por WB con los anticuerpos correspondientes. Se utilizó como proteína de control de carga la β -actina.

4.1 Papel del calcio en la respuesta apoptótica por tratamiento con EDLF

Mediante el marcaje con Fluo-4 (fluorocromo que se une al calcio citosólico) se detectó un aumento de los niveles de calcio citosólico tras la incubación de células de SE con EDLF (Figura N° 22, A). Al tratar las células con EDLF y marcarlas posteriormente con Fluo-4, se observó un aumento de la fluorescencia a partir de la primera hora de tratamiento (Figura N° 22, B). La cuantificación de la fluorescencia emitida por el Fluo-4 mediante citometría de flujo, reveló que a las 9 h de tratamiento se alcanzaba un porcentaje de fluorescencia cercano al 40% comparado con las células sin tratar (Figura N° 22, B), indicando un aumento en la concentración de calcio citosólico tras el tratamiento con EDLF en ambas líneas celulares.

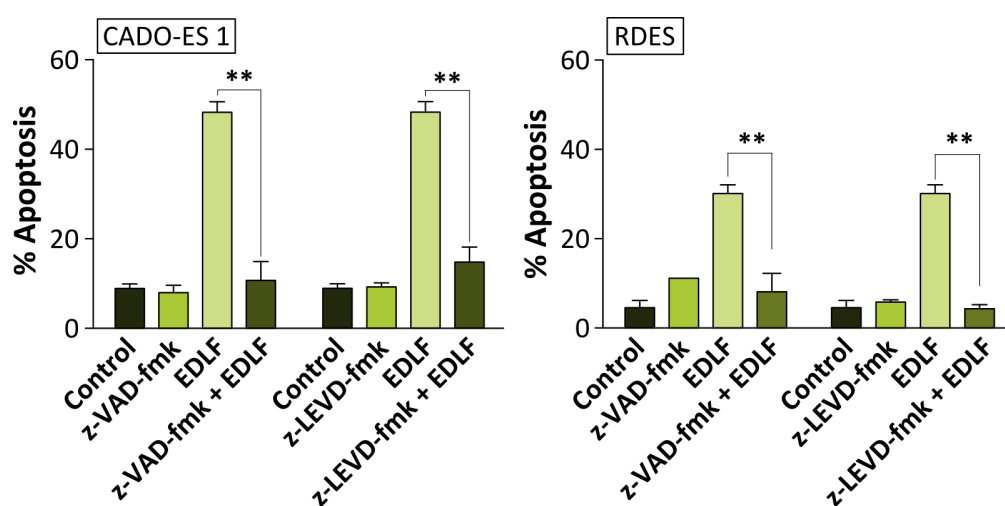


Figura N° 21: Efecto de la inhibición de la caspasa-4 en la actividad apoptótica de EDLF: Se inhibió la actividad de la caspasa-4 preincubando las células con el inhibidor (z-LEVD-fmk) (5 μ M) y posterior tratamiento con (10 μ M) durante 24 h. La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

Posteriormente, se analizó la relación del calcio liberado al citosol con la apoptosis en las líneas celulares de SE. Para ello, se empleó el agente quelante específico de calcio BAPTA-AM y se cuantificó el porcentaje de apoptosis tras 24 h de tratamiento con EDLF. Existe una disminución leve (27%), pero estadísticamente significativa, en el porcentaje de apoptosis al disminuir la concentración citosólica de calcio en la línea celular CADO-ES 1 (Figura N°22, C). Esta débil inhibición en la apoptosis inducida por EDLF al pretratar las células con BAPTA-AM fue incluso menor (24%) en el caso de la línea celular RDES.

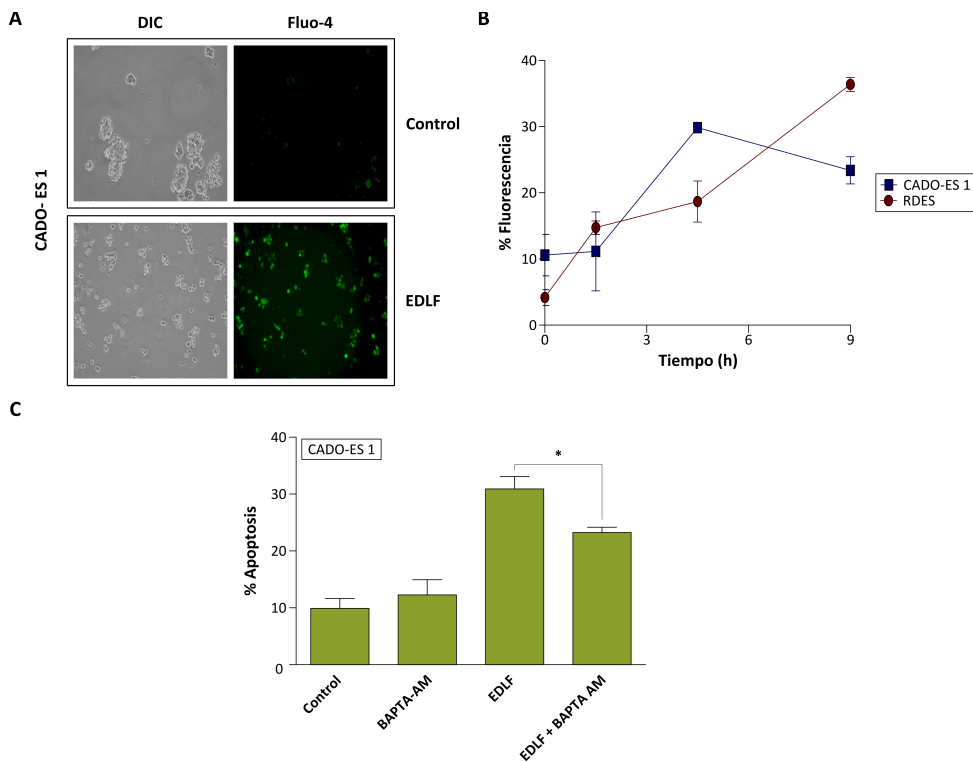


Figura Nº 22: Aumento de la concentración de calcio citoplasmático por acción de EDLF y efecto en el porcentaje de apoptosis de líneas celulares de SE: A. Imagen de microscopía de fluorescencia tras el tratamiento con EDLF (10 μ M) durante 3 h y marcaje con la sonda fluorescente Fluo-4. **B.** Cuantificación de la fluorescencia de Fluo-4 mediante citometría de flujo tras el tratamiento con EDLF (10 μ M) a los tiempos indicados y posterior marcaje con la sonda Fluo-4. **C.** Efecto del quelante de calcio citosólico BAPTA-AM en el porcentaje de apoptosis inducido por EDLF (10 μ M) tras 24 h de tratamiento. La apoptosis se cuantificó por análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados aquí representados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * p <0.05 (Student's *t*-test).

5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EDLF SOBRE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK EN SARCOMA DE EWING

5.1 Actividad JNK

Se estudió la activación de la quinasa JNK como marcador de estrés celular mediante técnicas de actividad JNK quinasa en fase sólida (GST-c-jun-223) y por *Western blot* convencional. Usando ambas técnicas se encontró una activación potente y persistente de JNK a partir de las 3 h de tratamiento en las dos líneas celulares de tratamiento que se mantiene hasta las 24 h de tratamiento (**Figura Nº 23, A**). Posteriormente se estudió el efecto de la inhibición de esta proteína sobre la apoptosis. Para ello, se empleó el inhibidor específico de JNK SP600625, encontrándose una reducción significativa de la apoptosis (56%) en la línea CADO-ES 1, mientras que en la línea celular RDES esta disminución resultó menor (32%), al comparar con las células tratadas únicamente con EDLF (**Figura Nº 23, B**).

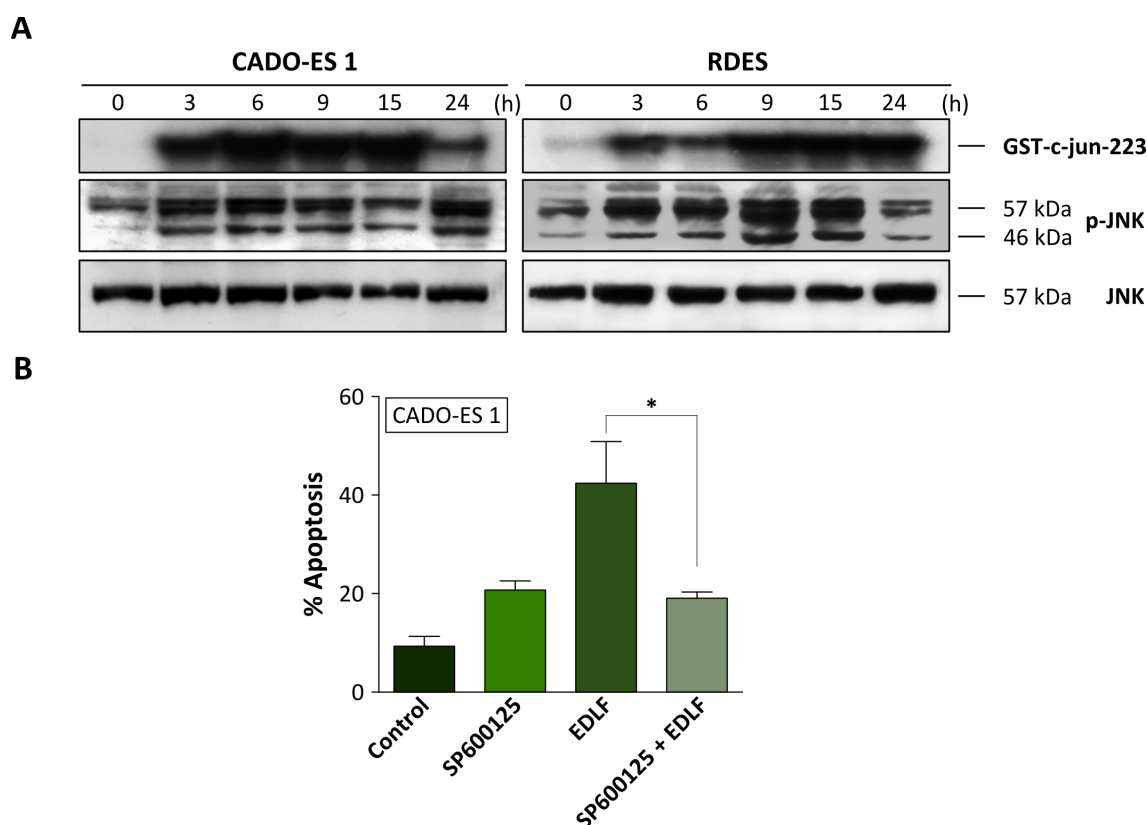


Figura N° 23: Activación de la quinasa JNK por acción de EDLF y efecto en la apoptosis en líneas celulares de SE: A. Estudio de la activación de JNK en las líneas de SE tras el tratamiento con EDLF (10 μ M) a los tiempos indicados. Este análisis se realizó mediante el ensayo de la actividad quinasa sobre c-Jun (GST-c-jun-1-223) y de WB convencional con los anticuerpos correspondientes. **B.** Efecto de la inhibición de JNK (inhibidor SP600125) sobre la apoptosis generada por EDLF en las líneas celulares de SE. El porcentaje de apoptosis se cuantificó mediante citometría de flujo. El grado de significación en el porcentaje de apoptosis por inhibición de JNK se realizó por comparación con las células tratadas únicamente con EDLF. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * p <0.05 (Student's t-test).

5.2 Actividad Erk 1/2

Se analizó la fosforilación de Erk1/2, que juega un papel importante en la ruta de supervivencia mediada por MAPKs. Se observó la fosforilación de Erk1/2 a partir de las 6 h de tratamiento con EDLF, que va disminuyendo progresivamente hasta las 24 h de tratamiento en el caso de la línea celular CADO-ES 1. Sin embargo, para la línea RDES se detectó la fosforilación de esta quinasa a partir de las 3 h, manteniéndose hasta las 15 h y desapareciendo a las 24 h de tratamiento (**Figura N° 24, A**).

Se analizó el efecto del inhibidor de MEK (U1026) (proteína situada "upstream" de la quinasa Erk en la ruta de las MAPKs) sobre la apoptosis en las dos líneas celulares. Inicialmente, se observó que las células al ser tratadas únicamente con el inhibidor aumentaron el porcentaje de apoptosis (15% para CADO-ES 1 y 12% para RDES) (**Figura N°24, B**). Al tratar las células con el inhibidor en combinación con la EDLF se observó

una ligera reducción de la apoptosis en las ambas líneas celulares, pero no fue estadísticamente significativa (**Figura N° 24, B**).

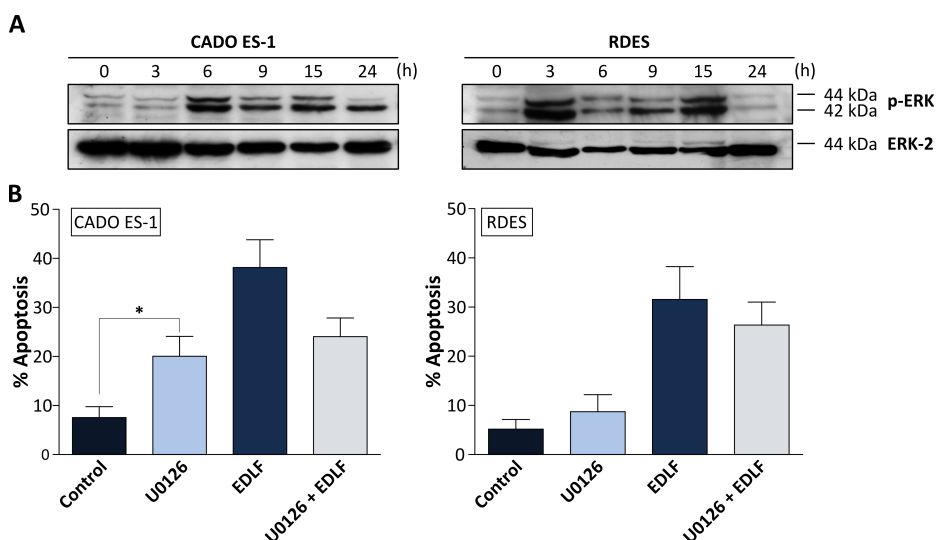


Figura N° 24: Estudio del efecto de EDLF sobre las rutas de señalización de Erk1/2 sobre líneas celulares de SE: A. Estudio de la activación de Erk 1/2 en las líneas de SE tras el tratamiento con EDLF (10 μ M) a los tiempos indicados. Las muestras se analizaron mediante WB con los anticuerpos correspondientes. **B.** Efecto de la inhibición de Erk (inhibidor U0126) sobre la apoptosis generada por EDLF (10 μ M) durante 24 h en las líneas celulares de SE. El porcentaje de apoptosis se cuantificó mediante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. El grado de significación de la inhibición de Erk se calculó comparando el efecto de solo el inhibidor con respecto a las células control. Los resultados son la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

6. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE EDLF EN SARCOMA DE EWING

Se evaluó el papel potencial de la mitocondria en la acción apoptótica de EDLF en las líneas celulares de SE. Inicialmente, se estudió el posible papel de la caspasa-9 en la acción de EDLF. Se encontró, mediante *Western blot*, la activación de la caspasa-9 a partir de las 6 h de tratamiento, mostrando la fragmentación de la procaspasa-9 a sus fragmentos activos (p17 y p10) (**Figura N° 25, A**). Este resultado se corroboró con el estudio de la actividad relativa de la caspasa-9 por métodos colorimétricos (**Figura N° 25, B**). Por otra parte, se analizó el efecto de la inhibición de la caspasa-9, mediante el uso del inhibidor específico de esta caspasa z-LE(OMe)HD(OMe)-fmk (z-LEHD-fmk, inhibidor irreversible) en la apoptosis inducida por EDLF. Se encontró que el inhibidor de la caspasa-9 produjo una disminución significativa de la apoptosis en las dos líneas celulares de SE, demostrando así la importancia de esta caspasa en el proceso apoptótico (**Figura N° 25, C**).

Además, se analizó el efecto de EDLF sobre la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales afectan al estado funcional de la mitocondria en procesos de apoptosis. Se

encontró la activación de la proteína proapoptótica Bax a partir de las 3 h de tratamiento, aumentando con el tiempo, especialmente a las 15 h de tratamiento en las dos líneas celulares de SE. Al estudiar la proteína antiapoptótica Bcl-2, se encontró que su expresión es débil en las dos líneas celulares y que con el paso el tiempo esta expresión permaneció inalterada (línea celular RDES) o disminuyó ligeramente partir de las 6 h de tratamiento (línea CADO-ES 1) (**Figura Nº 25, A**). La expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L no sufrió cambios por el tratamiento con EDLF (**Figura Nº 25, A**).

Por otra parte, se encontró la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria al citosol en las dos líneas celulares. En la línea celular CADO-ES 1 esta liberación se observó a partir de las 9 h de tratamiento permaneciendo hasta las 24 h. En la línea celular RDES la liberación de citocromo *c* se observó a partir de las 3h de tratamiento y disminuyendo a partir de las 15 h de tratamiento (**Figura Nº 25, A**).

Mediante el uso de las sondas DIOC₆(3) y DHE se estudiaron los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) respectivamente, tras el tratamiento con EDLF mediante citometría de flujo. Al tratar las líneas celulares con EDLF, se aprecia que hay un aumento en la producción de ROS en ambas líneas celulares a partir de las 3 h de tratamiento siendo más marcado en la línea celular CADO-ES 1 que en la línea celular RDES (**Figura Nº 26, A y B**). En cuanto al $\Delta\Psi_m$, se encontró en la línea celular CADO-ES 1 la disminución del potencial de membrana mitocondrial entre las 9 y 15 h de tratamiento, mientras que en la línea celular RDES no se encontraron cambios significativos en el $\Delta\Psi_m$ con el paso del tiempo (**Figura Nº 26, A y B**).

Para determinar el papel que tienen las ROS en la muerte celular de las líneas celulares de SE, se preincubaron las células con el agente antioxidante BHA (butil-hidroxi-anisol) y posterior tratamiento con EDLF. Se encontró que la preincubación de la línea celular CADO-ES 1 con BHA produjo una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis inducido por EDLF (**Figura Nº 26, D**).

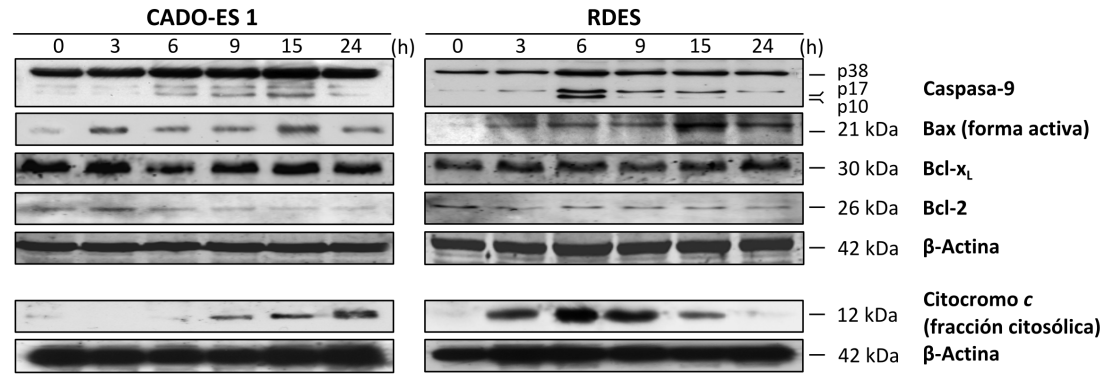
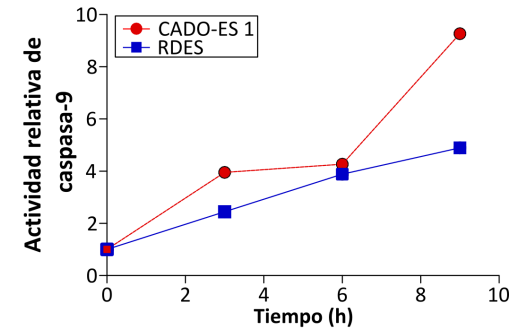
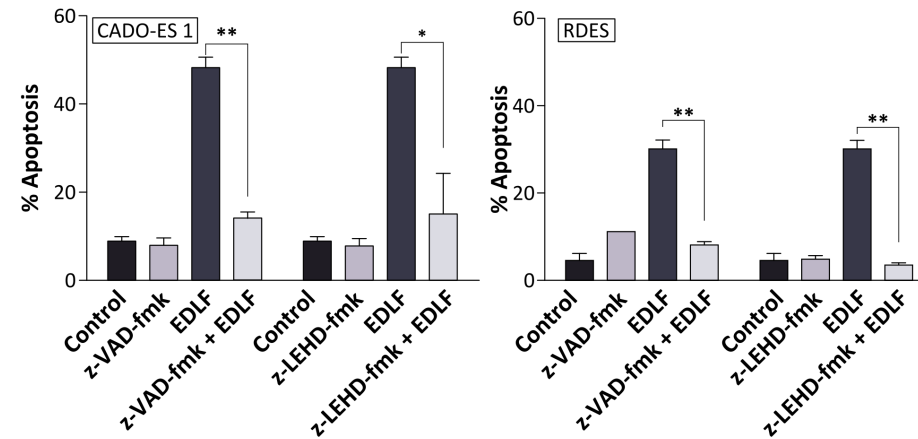
A**B****C**

Figura Nº 25: Activación de la ruta intrínseca de la apoptosis por efecto de EDLF en líneas celulares de SE: **A.** Efecto de la EDLF sobre las principales proteínas de la ruta intrínseca de la apoptosis en SE. Se trataron las células con EDLF a los tiempos indicados. Posteriormente, se analizaron las muestras mediante WB con anticuerpos específicos para determinar las proteínas indicadas. La determinación de la liberación al citosol de citocromo c se realizó mediante el fraccionamiento de proteínas mitocondriales y citosólicas. Se identificó la liberación del citocromo c en la fracción citosólica. **B.** Se evaluó la actividad relativa de la caspasa-9 por detección del cromóforo (pNA, p-nitroanilida) tras la fragmentación del sustrato marcado Ac-LEHD-pNA mediante espectrofotometría. **C.** Efecto del inhibidor específico de la caspasa-9 (z-LE(OMe)HD(OMe)-fmk)(z-LEHD-fmk) en la acción apoptótica producida por EDLF en células de SE. El porcentaje de apoptosis se realizó mediante citometría de flujo. La disminución en los porcentajes de apoptosis por efecto del inhibidor se realizó comparando las células tratadas con EDLF únicamente y en combinación con el inhibidor. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * p < 0.05; ** p < 0.01 (Student's t -test).

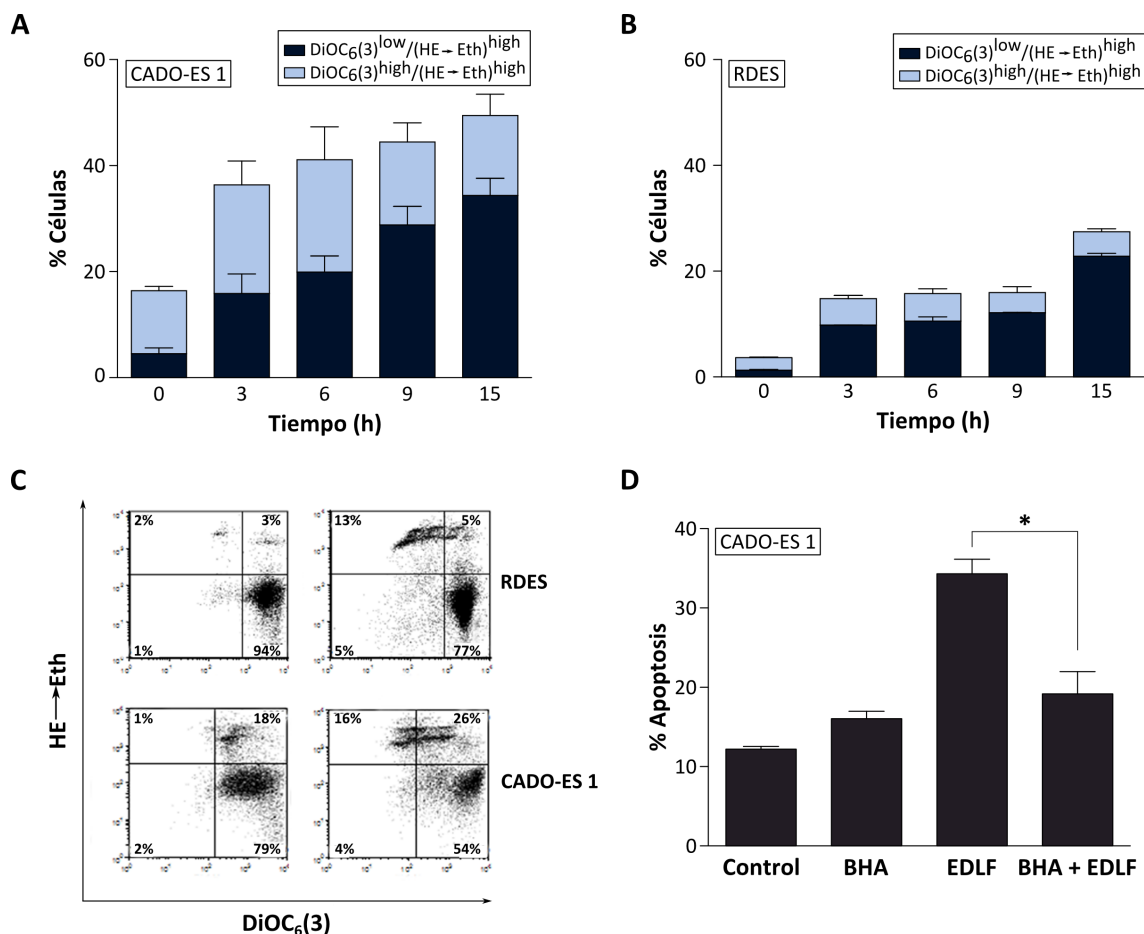


Figura N° 26: Estudio de las especies reactivas de oxígeno (ROS), análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y efecto del agente antioxidante BHA en la muerte celular en líneas celulares de SE por acción de EDLF: Se trataron células de SE con EDLF a varios tiempos de tratamiento. Posteriormente, las células se marcaron con sondas para mitocondria DiOC₆(3) y DHE y analizadas mediante citometría de flujo. **A.** Efecto temporal producido por EDLF (10 μ M) sobre las ROS y $\Delta\Psi_m$ en la línea celular CADO-ES 1. **B.** Efecto temporal producido por EDLF (10 μ M) sobre las ROS y $\Delta\Psi_m$ en la línea celular RDES. **C.** Representación gráfica del aumento de las ROS y $\Delta\Psi_m$ por tratamiento con EDLF (10 μ M) tras 6 h de tratamiento con respecto al control en las dos líneas celulares de SE. **D** Se trataron las células de SE con el antioxidante lipídico BHA (30 μ M) y posterior tratamiento durante 24 h con EDLF. El porcentaje de apoptosis se cuantificó mediante citometría de flujo. Esta figura es la representación de tres experimentos diferentes \pm E.S. * $<$ 0.05 (Student's *t*-test).

7. EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE EDLF EN SARCOMA DE EWING:

Mediante el modelo murino de xenotransplante, con la línea celular de sarcoma de Ewing CADO-ES 1, se analizó el efecto antitumoral de la administración oral de EDLF. Se evaluó si el compuesto es capaz de llegar al tumor, acumularse y activar la cascada apoptótica.

Durante el tiempo de tratamiento con EDLF, se observó una reducción significativa del tamaño tumor en los animales con la dosis más baja (30 mg/kg/día), comparado con los tumores de los animales que no recibieron tratamiento (control) (Figura N° 27, A). Tras el tratamiento con EDLF durante 21 días, se realizaron las autopsias de los animales, y no se encontraron alteraciones morfológicas en ninguno de los órganos en los animales tratados con

las dosis de estudio (datos no mostrados). Al analizar los tumores extraídos, se observó una disminución significativa del tamaño y el volumen del tumor en los animales tratados con EDLF en las dos dosis de estudio, con respecto a los animales que no recibieron tratamiento (**Figura Nº 27, B y C**). En el caso de la dosis de 30 mg/kg/día se encontró una reducción del 67% y del 50% en el volumen y tamaño del tumor respectivamente. Mientras que con la dosis de 40 mg/kg/día la reducción del volumen y tamaño de tumor fue del 90% y del 65%, respectivamente (**Figura Nº 27, B**).

De la misma manera, se realizó una comparación cualitativa de los niveles de vascularización de los tumores tanto en los animales que no recibieron tratamiento con respecto a los animales tratados. Se encontró a la dosis de 30 mg/kg/día, se presentaba una disminución en la vascularización de los tumores de todos los animales tratados (**Figura Nº 27, D**).

Además, se realizó un análisis inmunohistoquímico del tejido tumoral extraído tanto de los animales tratados (dosis 30 mg/kg/día), como de los animales control. Se emplearon marcadores característicos de proliferación (Ki67), apoptosis (caspasa-3), marcaje de núcleo para observar su integridad (hematoxilina-eosina), y marcadores de estrés de retículo endoplasmático (GADD153). Se observó en los tumores de los animales tratados con EDLF una pérdida de la integridad del núcleo por fragmentación del ADN (marcaje de hematoxilina-eosina). En cuanto al proceso proliferativo, los tumores extraídos de los animales tratados con EDLF presentan un menor número de células marcadas con Ki67 (**Figura Nº 27, E**) que los animales sin tratar. Al analizar la activación de la caspasa-3, se observó un aumento en la cantidad de células marcadas con actividad caspasa-3 en los tumores tratados con EDLF. Además, se observó un aumento en la expresión de GADD153, en los tumores de animales tratados con EDLF respecto a los animales sin tratar (**Figura Nº 27, E**).

Los estudios de biodistribución de EDLF se realizaron con el objetivo de evaluar la biodisponibilidad del compuesto en el lugar de acción, es decir en el tumor. Para ello, se cuantificó la cantidad de EDLF en muestras de tumor mediante la técnica de HPLC-MS. Se encontró que la EDLF se acumula en el tumor hasta una concentración de 20 µg/g de tejido (**Figura Nº 28**), indicando que la EDLF es capaz de llegar al sitio de acción. Esta concentración de EDLF en el tumor era superior a la concentración de EDLF medida en el plasma sanguíneo (menor de 5 µg/g) (**Figura Nº 28**), sugiriendo una acumulación de la EDLF en el tumor.

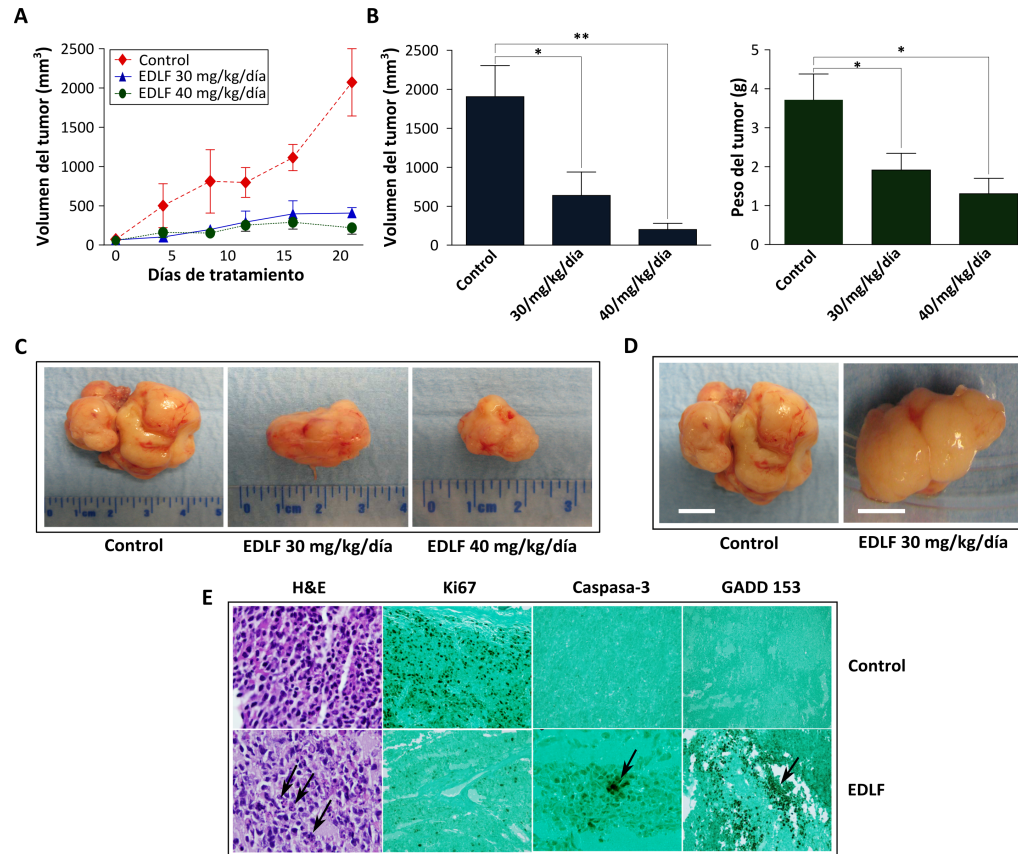


Figura Nº 27: Actividad antitumoral de EDLF *In vivo* en modelo xenotransplante con la línea celular CADO-ES 1: **A.** Variación del volumen del tumor tras el tratamiento con EDLF a las dosis indicadas, durante el tiempo de estudio. **B.** Comparación del volumen y el peso de los tumores aislados de los animales tratados con EDLF a las dosis de estudio, con respecto al grupo de animales sin tratar. Los resultados presentados corresponden a la media de cada grupo (n=7). El grado de significación de la reducción del volumen y tamaño del tumor en los animales tratados con EDLF, se obtuvo por comparación con los tumores de los animales sin tratamiento. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ (Student's *t*-test). **C.** Comparación cualitativa de la reducción del volumen de tumor en los animales tratados con EDLF con respecto a los animales sin tratar. Se muestra una imagen representativa. **D.** Comparación cualitativa de la vascularización de los tumores en los animales sin tratar y tratados con EDLF. La barra equivale a 1 cm. Se muestra una imagen representativa. **E.** Evaluación de marcadores de proliferación y apoptosis *in vivo* mediante inmunohistoquímica: se realizó el marcaje de segmentos de los tumores tratados (30 mg/kg/día) y de animales sin tratar con marcadores morfológicos (hematoxilina/eosina; núcleo), de proliferación (Ki67), de apoptosis (caspasa-3) y de estrés de retículo (GADD153).

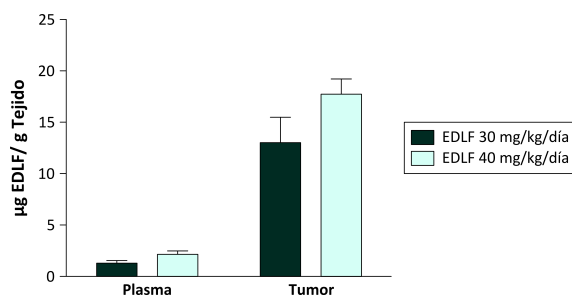


Figura Nº 28: Biodistribución de EDLF en tumor y plasma del modelo de xenotransplante en ratones inmunodeficientes: Se realizó la biopsia a cada uno de los animales y se tomaron muestras de plasma y tumor de tres animales por grupo. Se trataron las muestras de tejido como se describe en el apartado de materiales y métodos. La cuantificación de EDLF se realizó mediante la técnica de HPLC-MS. Se cuantificó y comparó la cantidad de EDLF acumulada en plasma y tumor para cada una de las dosis administradas. Los datos aquí mostrados corresponden a la media de tres animales \pm E.S.

8. PAPEL DE COLESTEROL EN LA INCORPORACION DE EDLF EN CELULAS DE SARCOMA DE EWING

Estudios previos han demostrado que la incorporación de EDLF en la célula tumoral es fundamental para el efecto antitumoral de este éter fosfolípido (Mollinedo et al 1997; Gajate et al. 2004; Gajate and Mollinedo 2007). Al estudiar la incorporación de [3 H]EDLF en cada una de las líneas celulares CADO-ES 1 y RDES, se observó una incorporación cercana a los 1000 pmol de EDLF por cada millón de células en ambas líneas celulares, disminuyendo significativamente (50%) al tratar las células con m- β CD, que elimina el colesterol de la membrana plasmática (**Figura Nº 29**). De la misma manera, al eliminar el colesterol en la membrana, se observó una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis para la línea celular CADO-ES 1 (**Figura Nº 29**). Estos resultados indican que la incorporación de EDLF en células de SE es dependiente en parte del contenido de colesterol de la membrana.

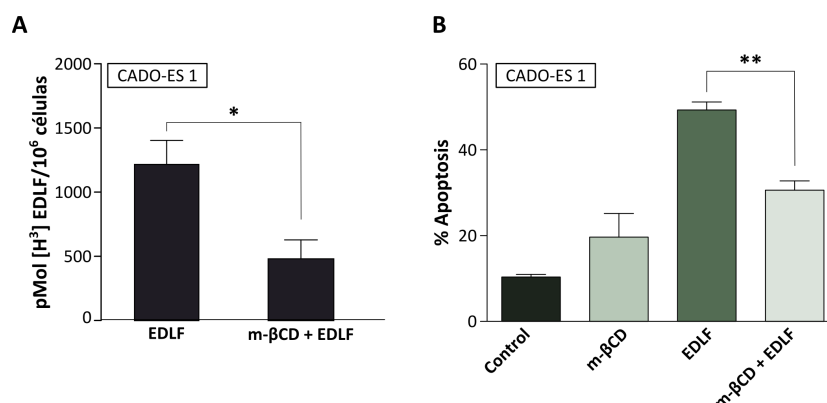


Figura Nº 29: Función del colesterol en la incorporación y acción apoptótica de EDLF en la línea celular CADO-ES 1: **A.** Las células se trataron con [3 H]EDLF (10 μ M) durante 1 h. La cuantificación se realizó mediante la técnica de centelleo. Las células se trataron con m- β CD (2.5 mg/mL) antes del tratamiento con [3 H]EDLF. **B.** Se trataron las células con m- β CD (2.5 mg/mL) y posteriormente se trataron con EDLF (10 μ M) durante 24 h. El porcentaje de apoptosis se determinó mediante citometría de flujo. La significación estadística en la incorporación de EDLF y de la apoptosis se realizó comparando las células tratadas solo con EDLF con las células tratadas en combinación con m- β CD. Los resultados son la media de tres experimentos independientes \pm E.S. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Student's t -test).

9. RECLUTAMIENTO DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS EN MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *RAFTS* TRAS EL TRATAMIENTO DE CELULAS DE SARCOMA DE EWING CON EDLF

Mediante inmunofluorescencia a través de citometría de flujo se observó que las células CADO-ES 1 y RDES expresan Fas/CD95 en su superficie celular (**Figura N° 30, A**). Asimismo, se observó por microscopía confocal que el tratamiento de células de SE con EDLF inducía una acumulación y co-localización del receptor de muerte Fas/CD95 en microdominios de membrana *rafts* (LR), identificados con marcaje con la subunidad beta de la toxina colérica que tiene afinidad por gangliosido GM1, un componente de LR (**Figura N° 30, B**). La co-localización de Fas/CD95 y de los LR se confirmó tras el aislamiento de estos dominios de membrana antes y después del tratamiento con EDLF mediante gradientes discontinuo de sacarosa (**Figura N° 30, C**). Se observó la presencia de señal para GM1 en las fracciones 3, 4 y 5 del gradiente localizando así en dichas fracciones los LR tanto en las células control como en las células tratadas (**Figura N° 30, C**). Para las células tratadas con EDLF se comprobó la presencia del receptor Fas/CD95 en las fracciones correspondientes a los LR (fracciones 3, 4 y 5). De la misma manera, se encontraron en las fracciones *raft*, aisladas de células tratadas con EDLF, proteínas que forman parte del complejo de muerte DISC, tales como FADD, así como el receptor de muerte DR4 (**Figura N° 30, C**). Al comparar la presencia de estas mismas proteínas en las células sin tratar, se encontró que estas proteínas estaban en las fracciones no *raft* (fracciones 10, 11 y 12) (**Figura N° 30, C**), indicando que el tratamiento con EDLF promueve la translocación de dichas proteína a los LR. Así mismo se observó el reclutamiento de la proteína implicada en estrés celular JNK en los dominios LR tras en tratamiento con EDLF (**Figura N° 30, C**).

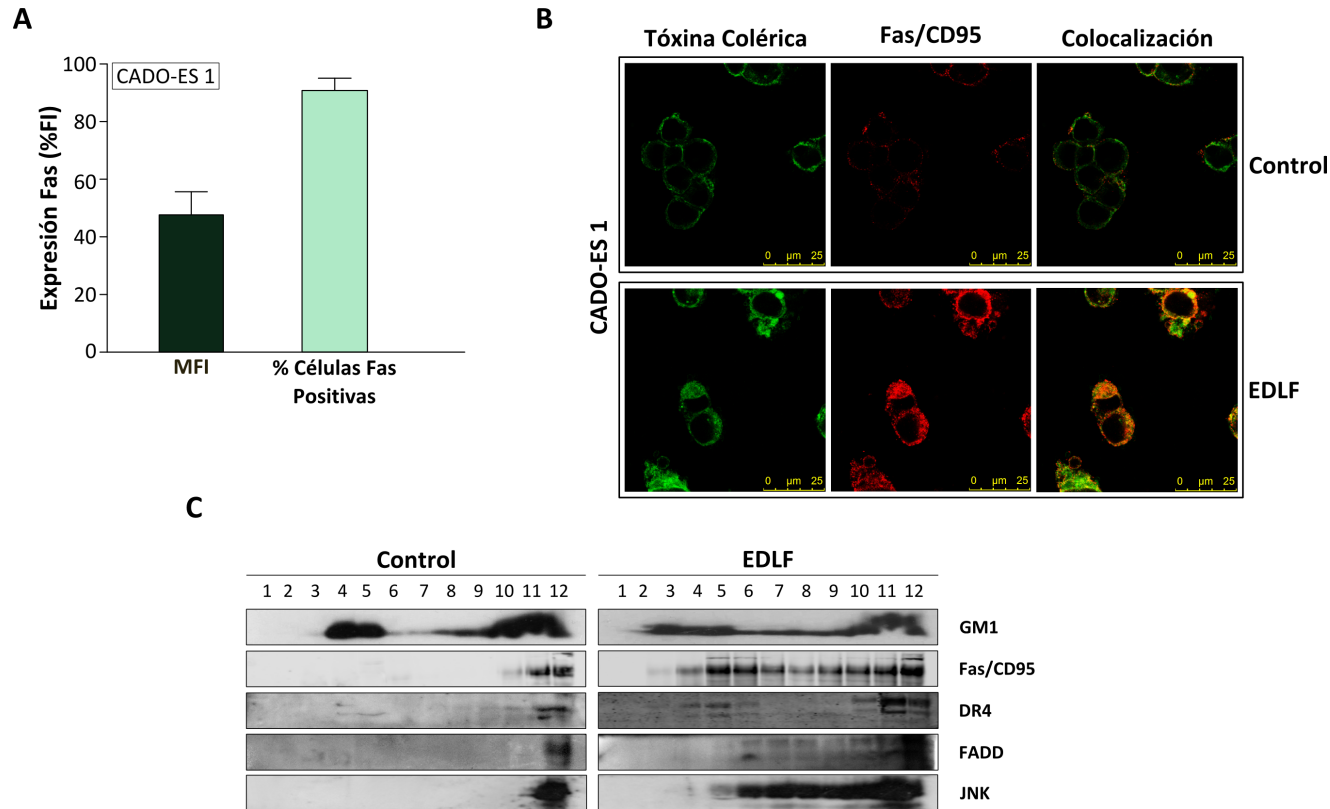


Figura N° 30: Expresión del receptor Fas/CD95 y reclutamiento del mismo, además de otras proteínas de muerte, en los microdominios de membrana rafts: A. La cuantificación del receptor se realizó por inmunofluorescencia con los anticuerpos correspondientes mediante citometría de flujo. Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) comparando con el sobrenadante de mieloma P3X63, utilizado como control negativo. **B.** Localización del receptor de muerte Fas/CD95 en células tratadas con EDLF en los LR por inmunofluorescencia. La visualización de los LR se realizó mediante la incubación con la subunidad B de la toxina colérica conjugada con isotiocianato de fluoresceína (fluorescencia verde). La identificación del receptor Fas/CD95 se realizó por incubación con el anticuerpo correspondiente de Fas/CD95 y posterior incubación con el anticuerpo secundario Cy3 (fluorescencia roja). La co-localización entre el receptor Fas/CD95 y los LR se encuentran en el panel colocalización (Fluorescencia amarilla). **C.** Reclutamiento de proteínas implicadas en apoptosis y estrés celular en los LR. El aislamiento de los LR se realizó mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (véase Materiales y Métodos). Para evaluar la presencia en los LR de estas proteínas, se empleó la técnica de WB utilizando los anticuerpos específicos correspondientes.

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

1. CITOTOXICIDAD DE ATLS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El CCC presenta altos niveles de resistencia al tratamiento actual, además de ser un tumor que se caracteriza por la evasión de la respuesta apoptótica como uno de sus principales mecanismos de tumorigenicidad (Fulda, 2009).

En primer lugar se analizó el efecto del tratamiento de diferentes lípidos antitumorales (ATLs) sobre las líneas celulares de CCC CAL 27 y CAL 33, a diferentes concentraciones para cada línea celular (10 μ M y 30 μ M respectivamente; a dosis menores la inducción de apoptosis fue muy escasa o irrelevante). El ATL con mayor actividad apoptótica resultó ser la EDLF, de forma que se encontró un porcentaje de apoptosis del 13% para la línea CAL 27 y del 8% para la línea CAL 33 a las 24 h de tratamiento con EDLF, aumentando al 27% y al 24% respectivamente a las 48 h de tratamiento (**Figura N° 31**). En el caso de los otros ATLs la sensibilidad fue menor. PERIF indujo un porcentaje de apoptosis del 18% y del 12% para las líneas CAL 27 y CAL 33, respectivamente a las 48 h de tratamiento (**Figura N° 31**). MILTEF mostró un 16% de apoptosis en ambas líneas celulares tras 48 h de tratamiento. Por último, la erucilfosfocolina (ERPC), tras 48 h de tratamiento, mostró un porcentaje de apoptosis del 8% para la línea CAL 27 y del 14% para la línea CAL 33 (**Figura N° 31**).

También se analizó el efecto de los ATLs sobre el ciclo celular de las líneas CAL 27 y CAL 33 (**Figura N° 32, A**). Tras el tratamiento con EDLF se observó en ambas líneas celulares un aumento en la fase Sub- G_1 acompañado de una disminución de la fase G_0/G_1 (**Figura N° 31, A**). Sin embargo, los ATLs con menor actividad apoptótica como MILTEF y ERPC indujeron un aumento de células en la fase G_2/M en ambas líneas celulares. Tras el tratamiento con MILTEF, la fase G_2/M aumentó un 40% y un 37% en las CAL 27 y CAL 33, respectivamente (**Figura N° 31, B**, y datos no mostrados). En el caso del tratamiento con ERPC, el incremento de la fase G_2/M en la línea CAL 27 fue del 30% respecto al control, y para la línea CAL 33 del 56% (**Figura N° 31, B**, y datos no mostrados).

2. SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE MUERTE CELULAR POR TRATAMIENTO CON EDLF EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO MEDIANTE VIDEOMICROSCOPIA DE TIME-LAPSE

Se realizó un seguimiento en célula viva mediante microscopía *time-lapse* del tratamiento con EDLF durante 24 h en las dos líneas celulares de CCC, lo que permitió observar los diferentes cambios morfológicos de las células durante este tiempo y determinar los tipos de muerte presentados en las células. Los vídeos se encuentran como archivo anexo a este documento (**Anexo N° 1, videos N° 1 - 4**).

En la línea celular CAL 27 se encontró una inhibición en la división celular y la presencia de burbujeo (*blebbing*), mostrando las características morfológicas típicas de la apoptosis. De la misma manera, se observa que algunas células presentan un desprendimiento de la placa, un aumento en el volumen celular y posterior estallido de la célula permitiendo la salida del contenido celular de forma descontrolada, mostrando las características morfológicas típicas de eventos necróticos (**video N° 2, Anexo N° 1**). En el caso de la línea celular CAL 33, se encontró también inicialmente una inhibición de la proliferación celular. Con el paso del tiempo, se observó la presencia de vacuolas alrededor del núcleo cuyo tamaño y cantidad aumentaba con el tiempo. Algunas de estas células presentan las características de células apoptóticas, tras la aparición de las vacuolas. Sin embargo, algunas células vacuolizadas permanecen adheridas a la placa sin mostrar algún tipo de muerte celular (**video N° 2, Anexo N° 1**).

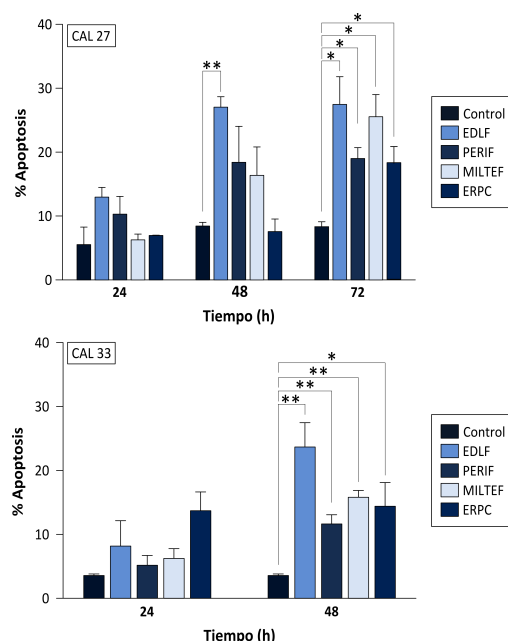


Figura N° 31: Estudio de la actividad apoptótica de los ATLS en líneas celulares de CCC: El porcentaje de apoptosis se determinó mediante la cuantificación de la fase Sub-G₁ del ciclo celular analizado mediante citometría de flujo. **A.** Se realizó un estudio comparado de los cuatro ATLS (EDLF, PERIF, MILTEF, ERPC) en las líneas CAL 27 (10 μ M) y CAL 33 (30 μ M) a los tiempos indicados. El grado de significación se realizó comparando el porcentaje de apoptosis de cada ATL con respecto a las células sin tratar. Los porcentajes de apoptosis corresponden al promedio de tres experimentos diferentes \pm S.E. ** $p < 0.01$ y * $p > 0.05$ (Student's *t*-test).

3. ACTIVACIÓN DE CASPASAS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EDLF EN LÍNEAS CELULARES EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Tras determinar la concentración más activa para la EDLF en las líneas celulares CAL 27 y CAL 33, se examinó la posible participación de caspasas en la respuesta apoptótica. La **Figura Nº 33, A**, muestra que el tratamiento con EDLF induce la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7, además de la fragmentación de PARP, sustrato de ambas caspasas. Además, la preincubación de células CAL 27 con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk, o con el inhibidor específico de la caspasa-3 Ac-DEVD-CHO, inhibió de una forma completa la inducción de apoptosis inducida por EDLF (**Figura Nº 33, B**).

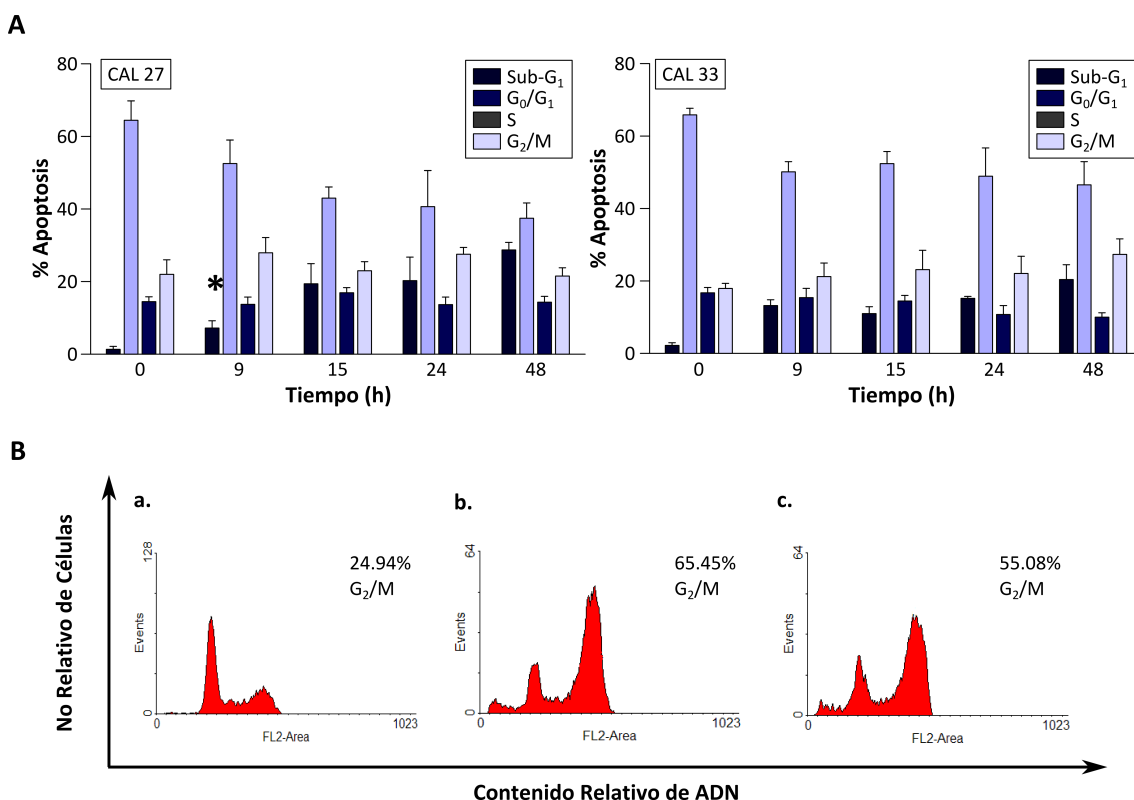


Figura Nº 32: Análisis del ciclo celular de líneas celulares de CCC por tratamiento con EDLF en función del tiempo de incubación (time-course): **A.** Se trataron las líneas de CCC con EDLF a los tiempos indicados. El análisis de ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. **B.** Representación de la parada en la fase G₂/M del ciclo celular de la línea celular CAL 27 tras el tratamiento con algunos ATLS: **a.** Células sin tratamiento, **b.** Células tratadas con MILTEF 10 μ M durante 24 h, **C.** Células tratadas con ERPC 10 μ M durante 24 h. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

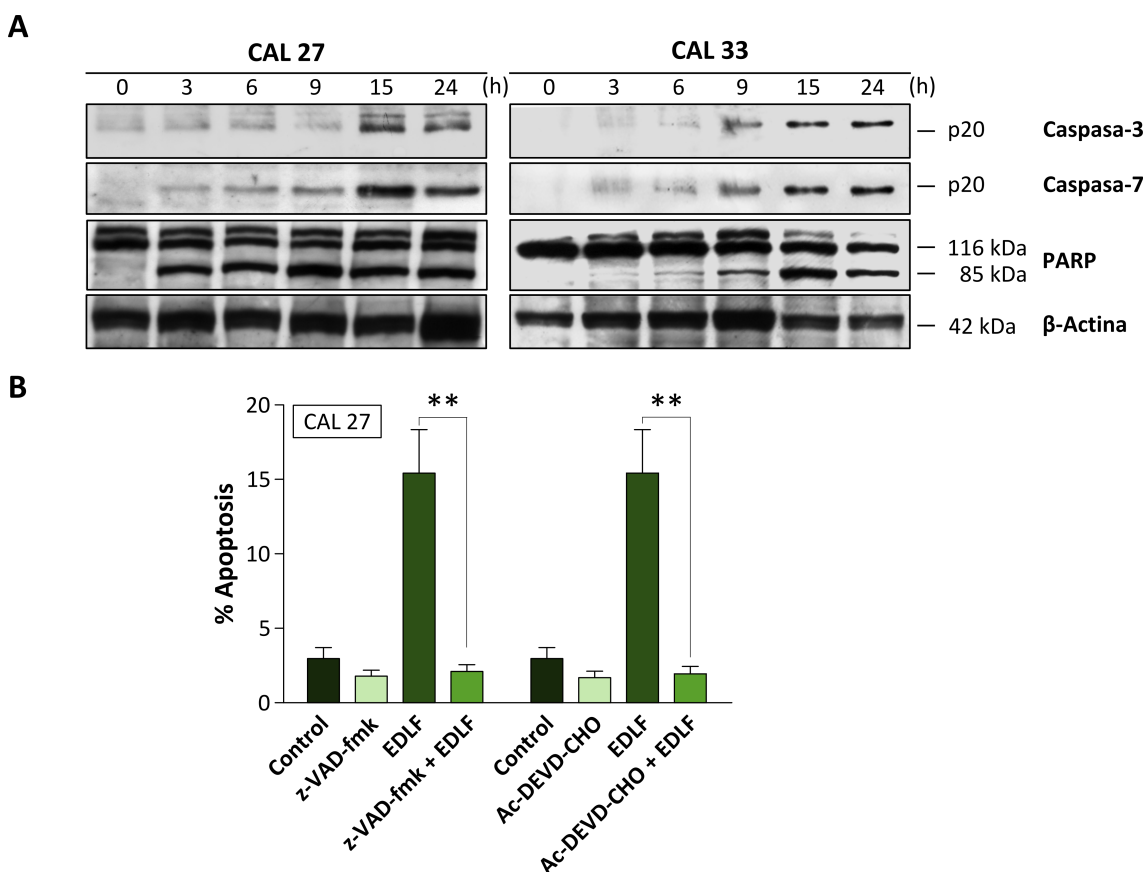


Figura Nº 33: Activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7, y fragmentación de PARP por acción de EDLF en líneas celulares de CCC: A. Las dos líneas de CCC se trataron con EDLF a las concentraciones de 10 μ M (CAL 27) y 30 μ M (CAL 33), y a los tiempos indicados en la figura. Se analizaron las muestras mediante WB, con los correspondientes anticuerpos específicos para determinar las proteínas indicadas. Se empleó como control de carga la proteína estructural β -actina. **B.** Efecto de la preincubación durante 1 h con el inhibidor pan-caspasa z-VAD-fmk (50 μ M) y el inhibidor específico de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO (50 μ M) sobre la inducción de apoptosis por EDLF (10 μ M) durante 24 h en células CAL 27. Las muestras se analizaron mediante ciclo celular en citometría de flujo. La significación estadística se obtuvo comparando las células tratadas con EDLF y células tratadas en combinación con el inhibidor. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. ** $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

4. PAPEL DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN EL MECANISMO DE ACCIÓN EDLF EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Primero se analizó la localización subcelular de la EDLF en células CAL 27 mediante el empleo del análogo fluorescente Et-BDP-ET (fluorescencia verde) y una versión de la proteína de fluorescencia roja RFP que colocalizaba con el marcador de retículo endoplasmático calreticulina (ER-RFP) (Klee & Pimentel-Muinos, 2005). Según se observa en la **Figura Nº 34, A**, el análogo de EDLF fluorescente se acumuló en el retículo endoplasmático.

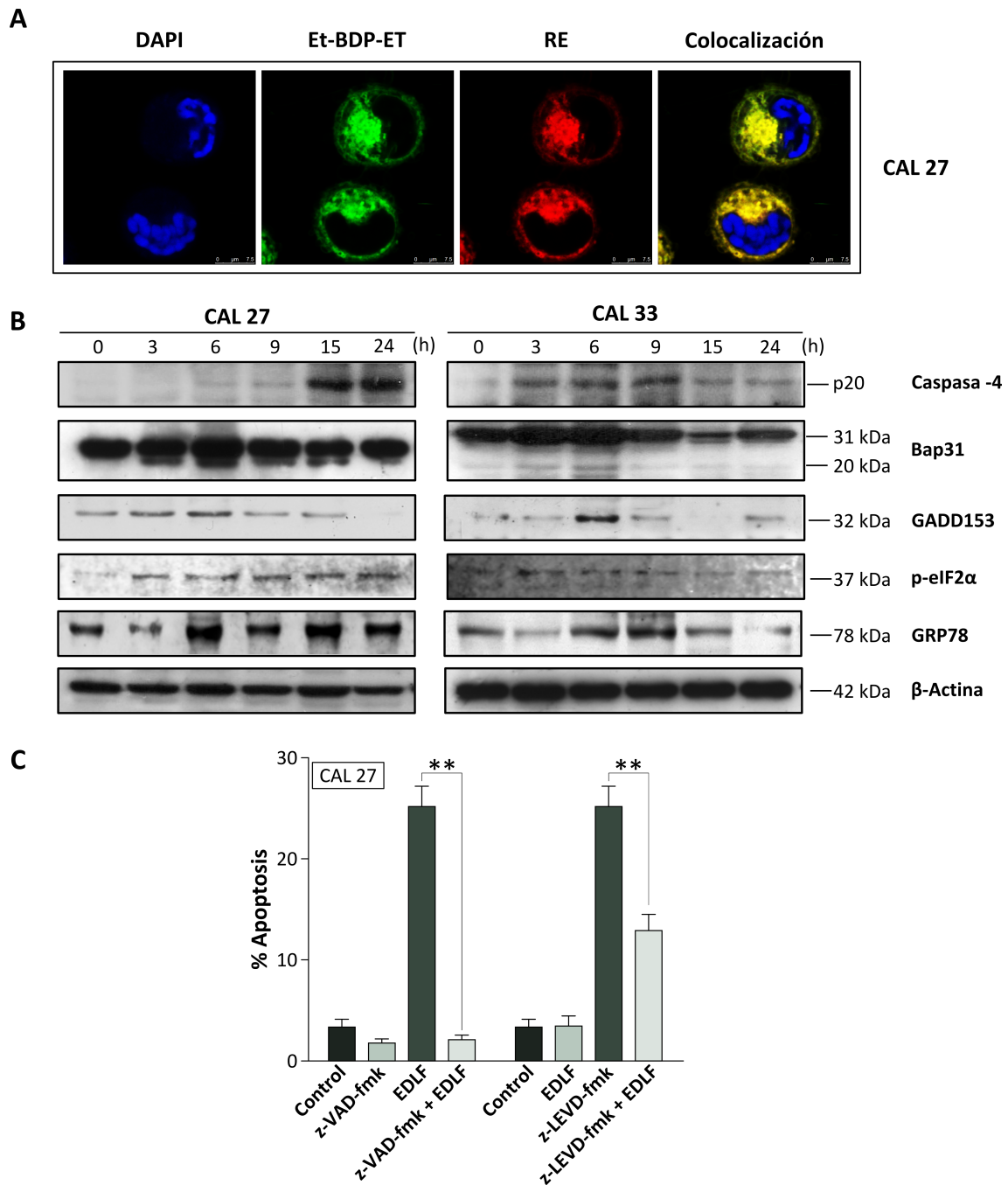


Figura Nº 34: Localización de EDLF en el RE y estrés de RE en líneas de CCC tratadas con EDLF: A. La línea celular CAL 27 se transfectó con el plásmido conteniendo RFP dirigido hacia RE (fluorescencia roja). Posteriormente, las células se incubaron con el análogo fluorescente de EDLF, Et-BDP-ET (10 μ M) (fluorescencia verde) durante 1 h. El núcleo de las células se marcó con DAPI (fluorescencia azul). Las áreas de colocalización entre el RE y Et-BDP-ET en el panel de colocalización son de color amarillo. **B.** Se trataron las células de CCC con EDLF a las respectivas concentraciones de estudio (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33), y a los tiempos indicados en la figura. A continuación, se analizaron las muestras por WB, empleando los anticuerpos específicos. **C.** Las células CAL 27 se preincubaron con el inhibidor pan-caspasa z-VAD-fmk a una concentración 50 μ M durante 1 h, y con el inhibidor específico de la caspasa-4 (z-LEVD-fmk) a una concentración 5 μ M durante 1 h. A continuación las células se trataron en ausencia o presencia de 10 μ M de EDLF durante 24 h. El porcentaje de apoptosis se determinó por ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados en esta figura corresponden a la media de tres resultados independientes \pm E.S. ** $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

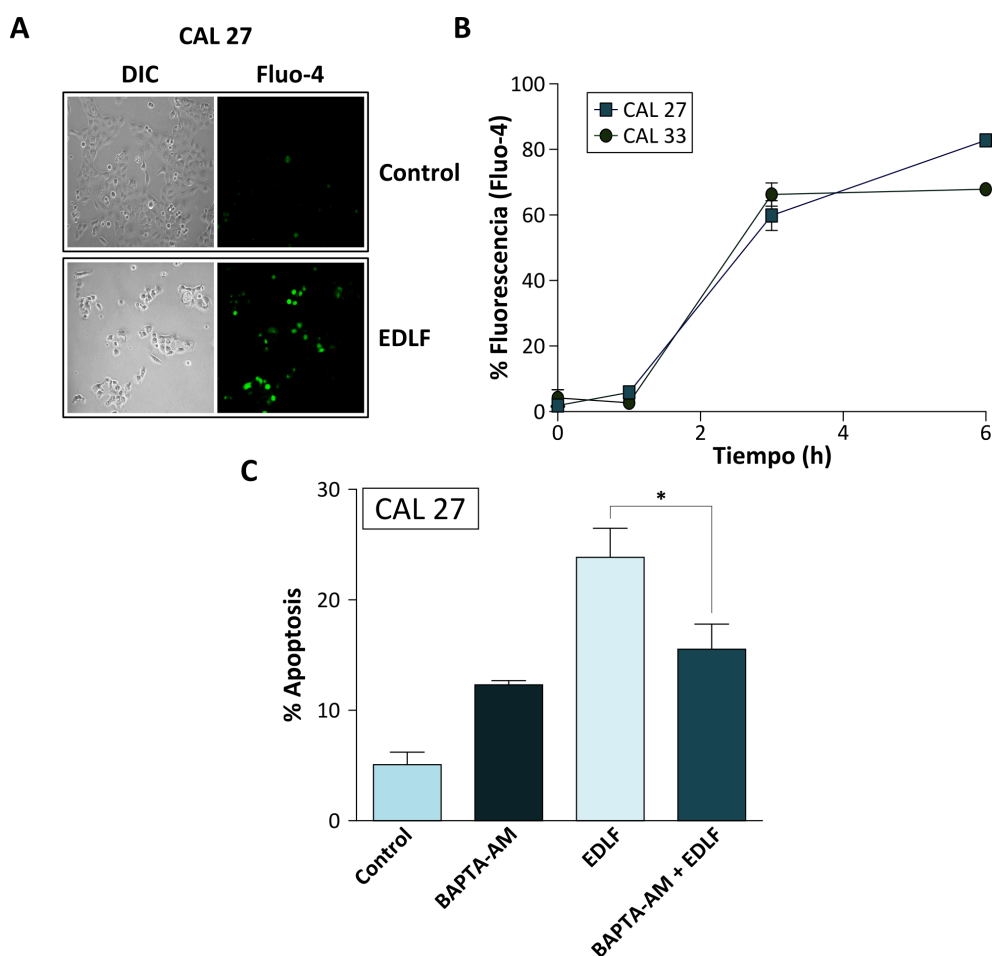


Figura N° 35: Efecto de EDLF en el aumento de la concentración citosólica de calcio libre en líneas celulares de CCC: Las líneas celulares de CCC se trataron con EDLF a las concentraciones respectivas (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) y a los tiempos indicados en la figura. A continuación, se marcaron las células con la sonda específica de calcio Fluo-4. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo. **A.** Tras el tratamiento con EDLF durante 1 h y marcaje con Fluo-4, se observaron las células CAL 27 por microscopía de fluorescencia y se capturaron las imágenes respectivas. **B.** Se cuantificó el porcentaje de fluorescencia de la sonda Fluo-4 durante las horas indicadas de tratamiento con EDLF, mediante citometría de flujo. **C.** Efecto del agente quelante de calcio BAPTA-AM en el porcentaje de apoptosis inducido por EDLF. Las células se incubaron durante 1 h con BAPTA-AM (10 μ M) y luego se trataron con EDLF (10 μ M) durante 24 h. El porcentaje de apoptosis se cuantificó mediante citometría de flujo. Los datos presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S.

Se realizó el estudio de las proteínas implicadas en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y en la maquinaria apoptótica activada ante la respuesta de estrés en el retículo endoplasmático tras el tratamiento con EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33). En la **Figura N° 34, B**, se observa una activación temprana de la caspasa-4 (caspasa activa p20) así como la fosforilación de eIF2 α a partir de las 3 h de tratamiento en las dos líneas celulares CAL 27 y CAL 33. Así mismo, la proteína relacionada con estrés de retículo GADD153, presenta un aumento transitorio en su expresión en ambas líneas celulares a partir de las 6 h de tratamiento (**Figura N° 34, B**). Para el caso de la proteína GRP78, no se observan cambios significativos en la expresión de esta proteína en la línea CAL 27, mientras que en la línea CAL 33 hay una disminución a partir de las 15 h de tratamiento (**Figura N° 34, B**).

Al estudiar el efecto de los inhibidores de la caspasa-4 sobre la muerte celular por EDLF, se encontró una reducción significativa en el porcentaje de apoptosis con respecto a las células tratadas únicamente con EDLF de un 51% en la línea celular CAL 27 (**Figura N° 34, C**).

Posteriormente se analizó mediante ensayos de fluorescencia con Fluo-4, si el tratamiento con EDLF producía un aumento de la concentración de calcio en el citosol en células de CCC. Se observó un aumento en la fluorescencia, indicativo de un incremento en la concentración de calcio libre citosólico, tras una hora de tratamiento con EDLF en células de CAL 27 (**Figura N° 35, A**). Así mismo, se cuantificó la fluorescencia en las dos líneas celulares CAL 27 y CAL 33, observándose que la concentración de calcio libre citosólico se incrementaba a partir de las 3 h de tratamiento en las dos líneas celulares (**Figura N° 35, B**).

La incubación de células CAL 27 con el agente quelante de calcio BAPTA-AM redujo de forma significativa la apoptosis inducida por EDLF (35% inhibición) (**Figura N° 35, C**).

5. IMPLICACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN EL PROCESO DE MUERTE DE EDLF EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Se estudió la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las variaciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tras el tratamiento con EDLF mediante citometría de flujo (marcaje con DHE (ROS) y DIOC₆(3) ($\Delta\Psi_m$)). Se observó un aumento en la producción de las ROS entre las 6-9 h (20-30%) de tratamiento en las dos líneas celulares (**Figura N° 36, A y B**). Por otra parte, se encontró en la línea celular CAL 27 un aumento inicial en el $\Delta\Psi_m$ durante las primeras 3 h de tratamiento, y una posterior disminución con el tiempo (**Figura N° 36, A y B**). Sin embargo, en la línea CAL 33 se observa una disminución en el potencial de membrana mitocondrial a partir de las 6 h de tratamiento. El efecto del agente antioxidante liposoluble BHA (butil-hidroxi-anisol) resultó en una reducción significativa de la apoptosis (de un 30% a un 10%) inducida por EDLF (**Figura N° 36, C**).

También se evaluó el efecto de EDLF sobre distintos marcadores de la activación de la ruta intrínseca mitocondrial de apoptosis. En la línea CAL 27, la caspasa-9 es activada a partir de las 3 h de tratamiento (**Figura N°**). Con respecto a las proteínas de la familia Bcl-2, se observó un ligero aumento en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en las dos líneas celulares (**Figura N° 37, A**). Por otra parte, al estudiar la proteína proapoptótica Bax, se observó su activación a partir de las 3 h en la línea celular CAL 27 que continua hasta las 15 h de tratamiento (**Figura N° 37, A**). Al evaluar la liberación del citocromo c, se encontró que en las dos líneas celulares hay liberación al citosol de esta proteína a partir de las 3 h de tratamiento, coincidiendo con el tiempo de activación de la caspasa-9 (**Figura N° 37, A**).

Al evaluar el efecto de la inhibición de la caspasa-9 sobre la apoptosis producida por EDLF, se observó una disminución potente y significativa en la apoptosis inducida en las líneas celulares de CCC (**Figura N° 37, B**)

Además se estudió la expresión de miembros de la familia de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis). En las dos líneas celulares se encontró la expresión constitutiva de las proteínas XIAP y survivin (**Figura N° 37, A**). Sin embargo, al ser tratadas con EDLF se presentó una disminución en la expresión de estas proteínas a partir de las 15 h de tratamiento en las dos líneas celulares.

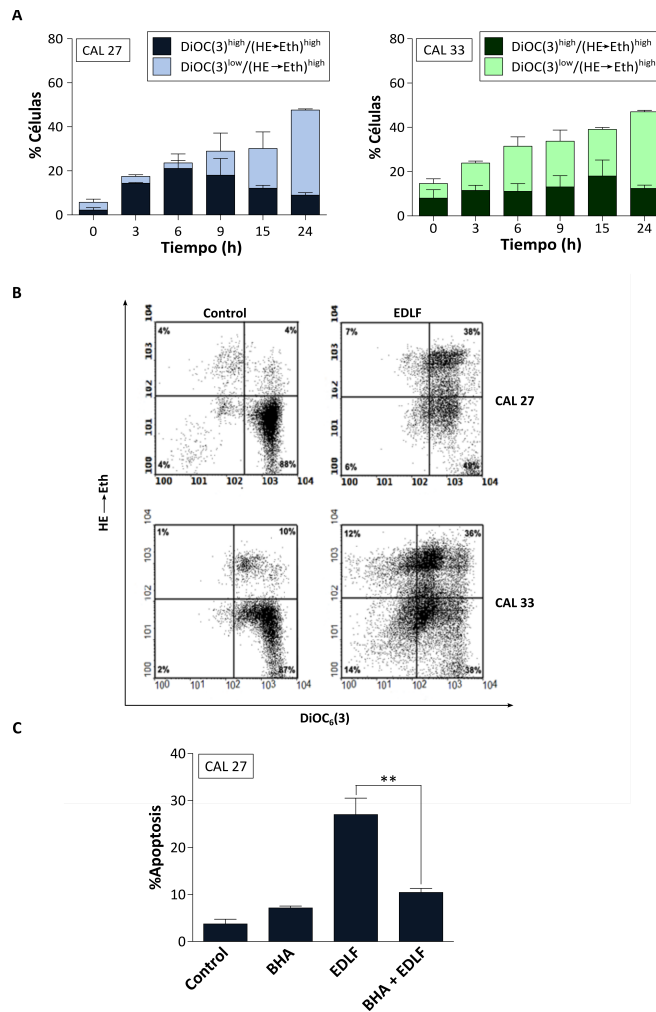


Figura N° 36: Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en líneas celulares de CCC tratadas con EDLF: A. Las células de CCC se trataron con EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) a los tiempos señalados. A continuación, se marcaron con el compuesto fluorescente DHE (cuantificación de ROS, $\text{DiOC}_6(3)^{\text{high}}/(\text{HE}\rightarrow\text{Eth})^{\text{high}}$) y $\text{DiOC}_6(3)$ (cuantificación de $\Delta\Psi_m$, $\text{DiOC}_6(3)^{\text{low}}/(\text{HE}\rightarrow\text{Eth})^{\text{high}}$) durante 30 min. Posteriormente, se cuantificó la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo. **B.** Representación del aumento en la producción de ROS (HE→Eth) y pérdida del $\Delta\Psi_m$ ($\text{DiOC}_6(3)$) en las líneas celulares de CCC a las 9 h de tratamiento con EDLF. **C** La línea celular CAL 27 se preincubó con el antioxidante lipídico BHA (butil-hidroxi-anisol) a una concentración de 30 μ M durante 1 h. A continuación, se trataron las células en ausencia o presencia de 10 μ M EDLF durante 24 h. Se comparó la diferencia en el porcentaje de muerte con el uso de BHA + EDLF y EDLF. Los resultados representados en esta figura corresponde a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

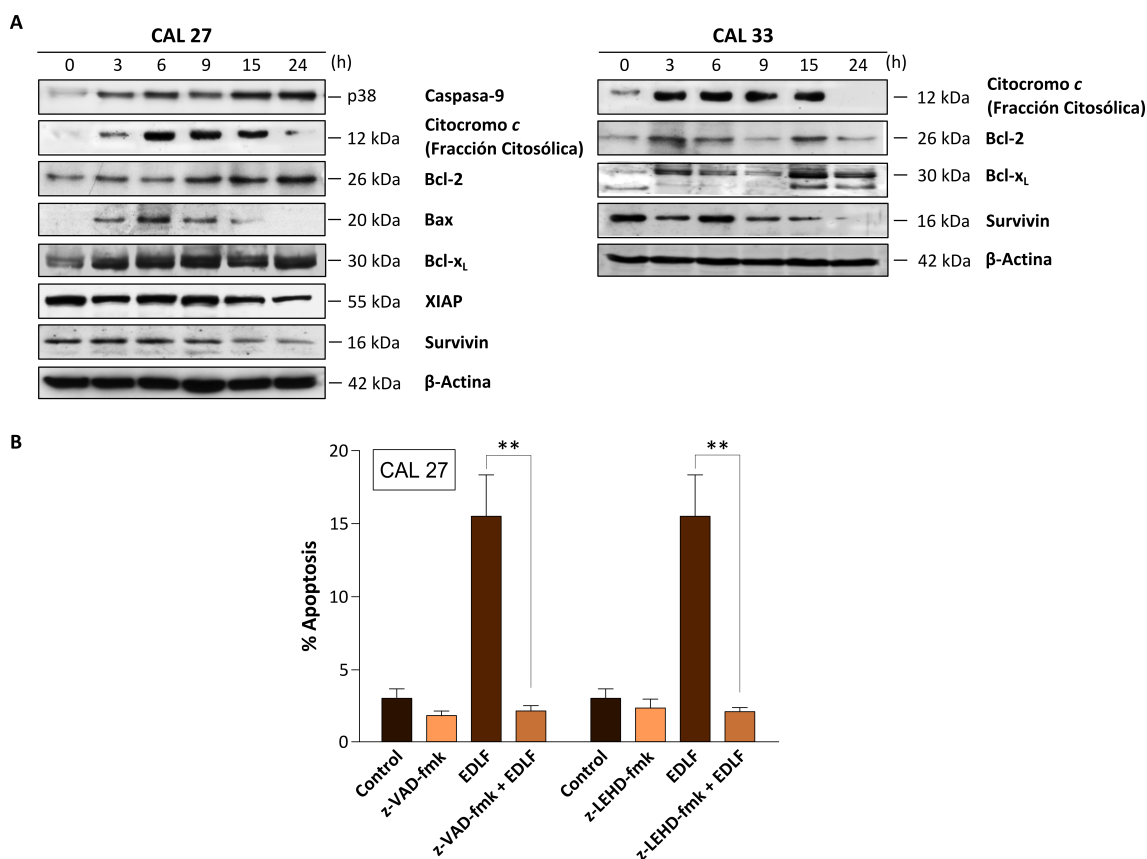


Figura N° 37: Participación de la ruta intrínseca de la apoptosis en el proceso de muerte de células de CCC por tratamiento con EDLF: A Se trataron las células de CCC con EDLF a las concentraciones de estudio (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante el tiempo indicado en la figura. A continuación, se analizaron los extractos proteicos mediante WB con los anticuerpos indicados. **B** La línea celular CAL 27 se incubó con el inhibidor general de caspasa z-VAD-fmk (50 μ M) con el inhibidor específico de caspasa-9 z-LEHD-fmk (50 μ M) durante 1 h. A continuación se trataron las células con EDLF a una concentración 10 μ M durante 24 h. Posteriormente, se fijaron las células y se cuantificó el porcentaje de apoptosis mediante citometría de flujo. La significancia estadística de la muerte celular, se realizó mediante la comparación de las células tratadas con EDLF y las células tratadas con EDLF en combinación con el inhibidor. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. ** $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

6. ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA JNK COMO MARCADOR DE ESTRÉS CELULAR EN LÍNEAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Mediante el empleo de técnicas de determinación de la actividad JNK por fosforilación de la proteína de fusión GST-jun y por *Western blot*, se estudió la activación de la quinasa JNK en las líneas de CCC tras su incubación con EDLF. Se encontró para la línea CAL 27 la activación de JNK a partir de las 3 h de tratamiento, manteniéndose hasta las 24 h de **tratamiento (Figura N° 38, A)**. En el caso de la línea CAL 33 esta activación se presentó a partir de las 6 h de tratamiento, persistiendo igualmente hasta las 24 h (**Figura N° 38, A**).

Al emplear el inhibidor específico de JNK (SP600125) se encontró una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis en las dos líneas celulares de CCC con respecto a las células tratadas únicamente con EDLF, especialmente para la línea CAL 27, donde esta reducción llegó al 70% (**Figura N° 38, B**).

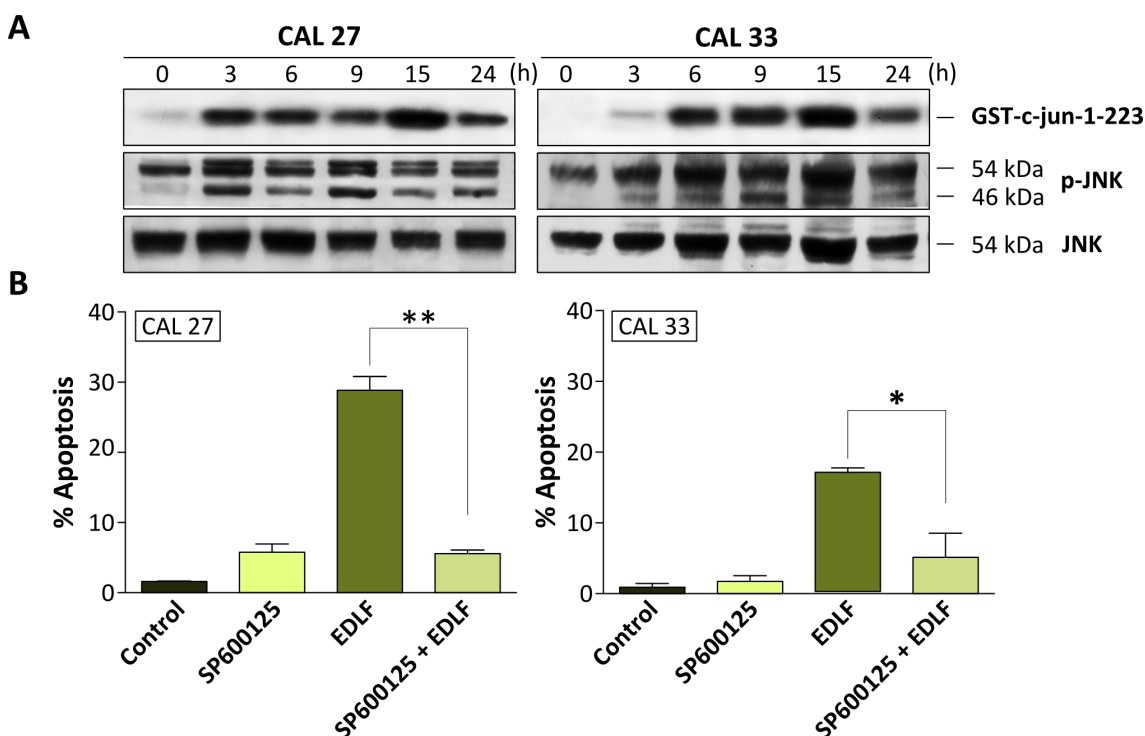


Figura N° 38: Activación de la ruta de señalización de JNK en la respuesta apoptótica inducida por EDLF en líneas celulares de CCC: A. Se trataron las dos líneas celulares de CCC CAL 27 y CAL 33 con las respectivas concentraciones de EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante los intervalos de tiempo representados, se obtuvieron los extractos proteicos y se analizaron mediante ensayo de actividad quinasa de c-Jun y por técnica de WB, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. **B.** Las líneas celulares de CCC se preincubaron con el inhibidor de JNK (SP600125) a una concentración de 20 μ M durante 1 h y posteriormente se trataron en ausencia y presencia de EDLF a la concentración correspondiente (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante 24 h. La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante el análisis del ciclo celular de la fase Sub-G₁ por citometría de flujo. El grado de significación estadística en la disminución de la apoptosis a causa de la inhibición se calculó con respecto a las células tratadas solo con EDLF. **p<0.01 y *p<0.05 (Student's t-test). Los resultados aquí mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S.

7. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE PI3K/AKT EN EL MECANISMO DE MUERTE CELULAR DE EDLF

Se analizó la participación de Akt, una de las principales proteínas implicadas en las rutas de señalización de PI3K/Akt, en el mecanismo de acción de EDLF. Se encontró para las dos líneas celulares de CCC una disminución de la fosforilación en el residuo Ser273 de Akt a partir de las 6 h de tratamiento (**Figura N° 39, A**). Al observar el efecto de los inhibidores específicos de Akt (III y X) en la apoptosis en ambas líneas celulares, se observó un aumento significativo en la muerte, al tratar las células únicamente con los inhibidores en las dos líneas celulares (un 20% con el inhibidor de Akt III y hasta un 15% con el inhibidor de Akt X)(**Figura N° 39, B**). Al tratar las células con EDLF más el inhibidor Akt III, hay una potenciación en la inducción de muerte significativa inducida por EDLF. Sin embargo, al tratar las células de manera conjunta con el inhibidor de Akt X y con EDLF, se observó un descenso significativo en el porcentaje de apoptosis para las dos líneas celulares estudiadas (hasta un 50% menos con respecto a la apoptosis generada por el tratamiento único de EDLF)(**Figura N° 39, B**).

Al estudiar el efecto del inhibidor de PI3K LY294002, se observó que LY294002 por sí solo inducía una débil respuesta apoptótica en CAL 27 y CAL 33, menor que la inducida por EDLF, pero la incubación conjunta de LY294002 con EDLF no potenciaba significativamente la respuesta apoptótica inducida por EDLF (Figura N° 39, C).

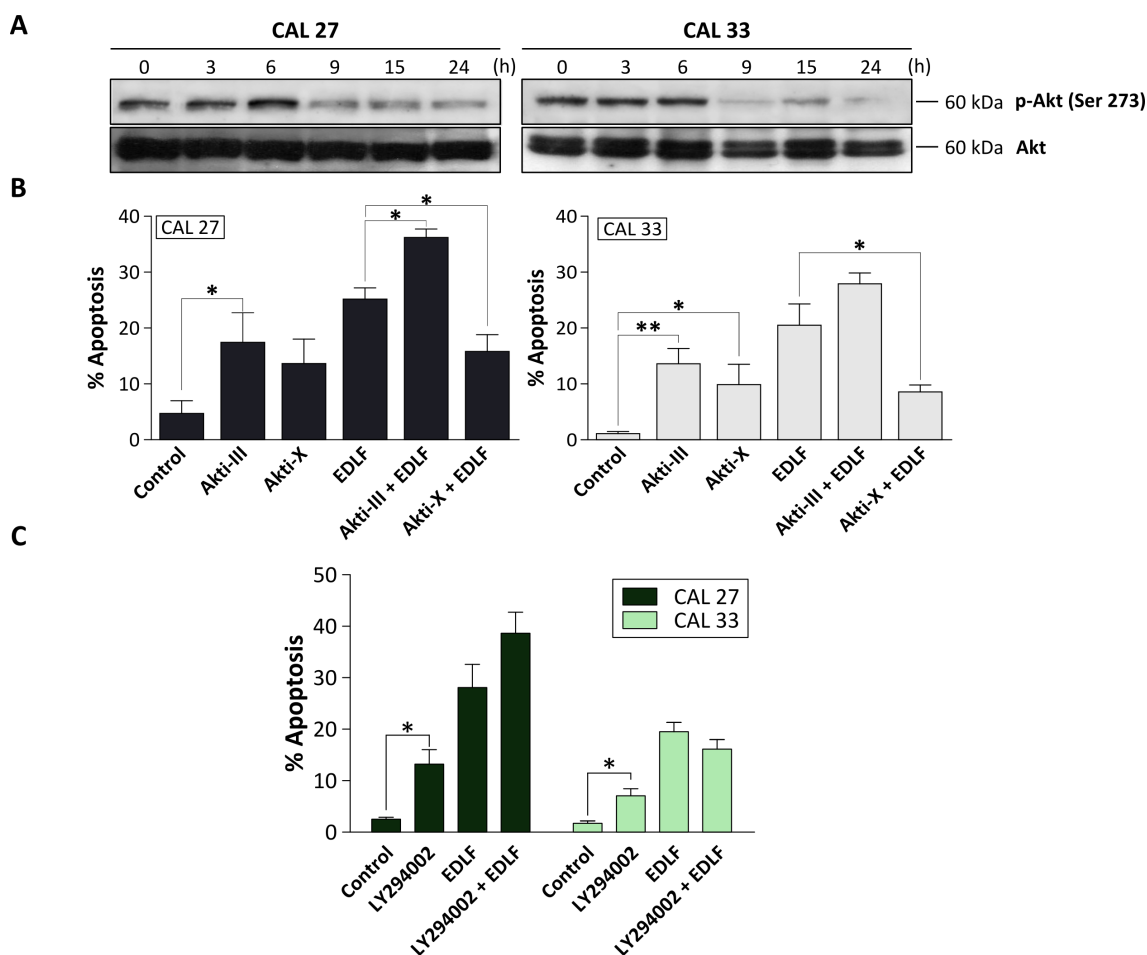


Figura N° 39: Efecto de EDLF sobre las rutas de señalización de PI3K/Akt en líneas celulares de CCC. **A.** Se trataron las líneas celulares CAL 27 y CAL 33 con las concentraciones respectivas de EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) a los tiempos indicados. Posteriormente las células se lisaron y se obtuvieron los extractos proteicos para ser analizados por WB con los anticuerpos correspondientes. **B.** Se preincubaron las dos líneas celulares con los inhibidores de Akt correspondientes (inhibidor Akt III (10 μ M) e inhibidor Akt X (5 μ M)) durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron en ausencia o presencia de EDLF a las respectivas concentraciones (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante 24 h. La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo. **C.** Cada una de las líneas celulares se preincubaron durante 1 h con el inhibidor LY294002 a una concentración 10 μ M. A continuación, las células se incubaron en ausencia o presencia de EDLF a las concentraciones respectivas (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante 24 h. La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados en esta figura corresponden a la media de tres experimentos diferentes \pm E.S. * p <0.05 (Student's *t*-test).

8. EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE MUERTE ALTERNATIVOS A LA APOPTOSIS PRODUCIDOS POR EDLF EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

8.1 *Necrosis:*

Se cuantificó la viabilidad celular y la integridad de la membrana celular de las dos líneas celulares mediante el ensayo de viabilidad celular por marcaje con *trypan blue* e incorporación de Ioduro de propidio (IP) en células sin permeabilizar. Estos ensayos permiten evaluar el porcentaje de muerte total de las células por pérdida de la integridad de la membrana celular.

Dado que los resultados anteriores mostraban una no muy potente inducción de apoptosis por EDLF en las líneas de CCC, especialmente en las células CAL 33, sin que se llegara a una total respuesta apoptótica en estas células, incluso tras 72 h de incubación, a pesar de que los ensayos de videomicroscopía mostraban que las células se afectaban por el tratamiento con EDLF de forma generalizada, se decidió analizar si EDLF podría inducir rutas de muerte celular alternativas.

Utilizando la incorporación de IP en células no permeabilizadas como método de determinación de necrosis, se encontró para la línea CAL 27 un aumento en la incorporación de IP de hasta un 60% a las 24 h de tratamiento con respecto al control, y para el caso de la línea CAL 33 se encontró un aumento del 40% en la incorporación a las 24 h (**Figura Nº 40, A**).

Se estudió el efecto de inhibidores tanto de apoptosis (z-VAD-fmk) como de necroptosis (necrostatina-1) en la muerte celular por tratamiento con EDLF (*time-course* de incorporación de IP). La inhibición de apoptosis con z-VAD-fmk condujo a un aumento significativo en la cantidad de IP incorporada en la línea CAL 27 a partir de las 3 h de tratamiento, mientras que en la línea CAL 33 aumentó a partir de las 6 h de tratamiento (**Figura Nº 40, B**). Al tratar las células con necrostatina-1 en combinación con EDLF se producía una disminución en la cantidad de IP incorporado en la línea CAL 27 a partir de las 3 h de tratamiento, aunque a tiempos largos (9 h) esta inhibición se pierde (**Figura Nº 40, C**). Sin embargo, en la línea celular CAL 33, se observó una disminución significativa en la incorporación de IP a partir de las 3 h de tratamiento que se mantiene con el tiempo (**Figura Nº 40, C**).

De forma paralela se estudió el efecto de estos mismos inhibidores en el porcentaje de apoptosis con el tratamiento con EDLF. Al inhibir la necroptosis mediante el uso de necrostatina-1, se encontró un aumento significativo en el porcentaje de apoptosis inducido por EDLF a partir de las 9 h en la línea CAL 27 (**Figura Nº 41, A**) y de las 6 h en la línea CAL 33 (**Figura Nº 41, B**). Por otra parte, al inhibir la apoptosis con el inhibidor pan-caspasa z-VAD-fmk, se encontró una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis desde las 3 h de tratamiento en las dos líneas celulares (**Figura Nº 41, A y B**).

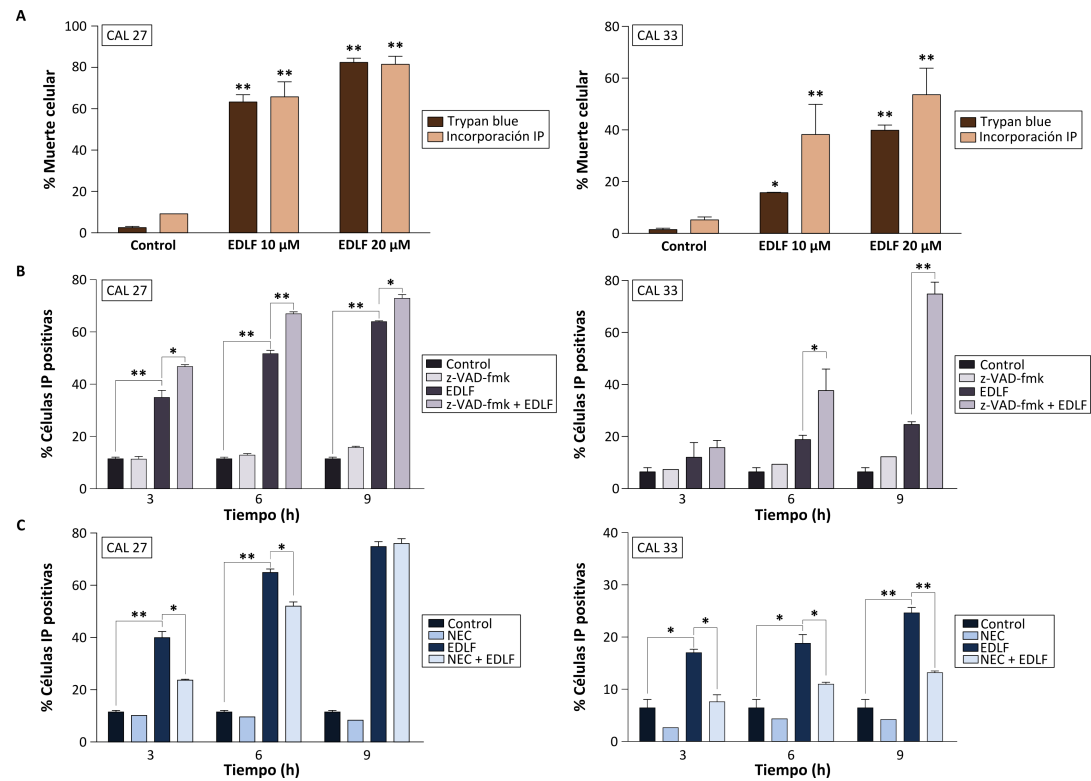


Figura N° 40: Muerte celular de líneas de CCC por pérdida de la integridad de la membrana celular tras el tratamiento con EDLF y efecto de z-VAD-fmk y necrostatina-1: **A.** Las células se trataron con EDLF a las concentraciones indicadas durante 24 h. A continuación, se marcaron con *trypan blue* y se realizó el conteo de las células capaces de incorporar el colorante. Para el caso de la incorporación de IP, las células sin permeabilizar se lavaron con PBS y se marcaron con una solución de IP (1 mg/mL) durante 5 min. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo por cuantificación de la fluorescencia emitida por el IP. **B.** Las células se trataron con el inhibidor pan-caspasa z-VAD-fmk durante 1 h a una concentración 10 μ M, y posteriormente con EDLF a las concentraciones empleadas en el estudio de apoptosis (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) a los tiempos indicados. A continuación, las células se marcaron con una solución de IP durante 5 min y se analizaron las muestras por citometría de flujo. **C.** Las células se trataron con necrostatina-1 (NEC) a una concentración 80 μ M durante 1 h, luego se trataron las células con EDLF a las concentraciones correspondientes (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) y a los tiempos indicados. Las células se marcaron con IP y se analizaron mediante citometría de flujo. El grado de significación estadística se obtuvo por comparación de las células tratadas solo con EDLF con respecto a las células tratadas con los respectivos inhibidores. Los datos mostrados en esta figura corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm E.S. ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

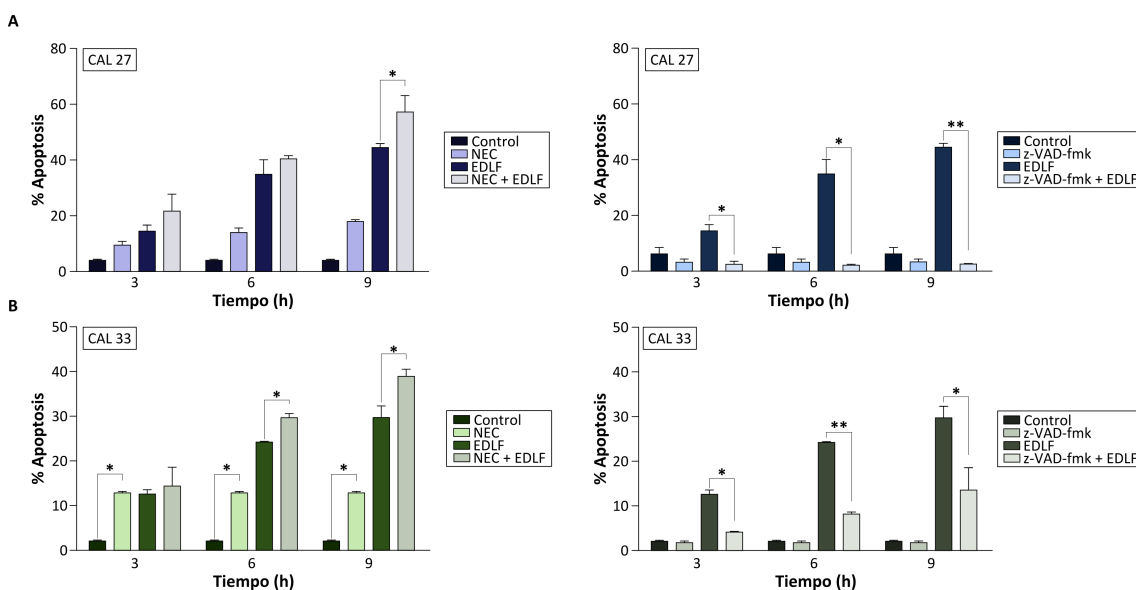


Figura No 41: Efecto de necrostatina-1 en el porcentaje de apoptosis de células tratadas con EDLF: **A** Se trataron las líneas celulares de CCC con el inhibidor de necrosis necrostatina-1 (NEC) a una concentración 80 μ M, durante 1 h. A continuación se trataron las células con EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante los tiempos indicados. Posteriormente, las células se fijaron y se cuantificó el porcentaje de apoptosis por medio del análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo. **B** Las células de CCC se trataron con el inhibidor general de las caspasas z-VAD-fmk a una concentración 10 μ M durante 1 h. A continuación, las células se trataron con EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante los tiempos mostrados en la figura. Se realizó el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de apoptosis. El grado de significación estadística se calculó comparando las células tratadas con únicamente con el inhibidor respecto a las células sin tratar, y la comparación del tratamiento de cada inhibidor más EDLF se realizó con respecto a las células tratadas solo con EDLF. Los datos mostrados en esta figura corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm S.E. * p <0.05 y ** p <0.01 (Student's t -test).

8.2 Autofagia:

Inicialmente se analizó la expresión de dos proteínas características en la inducción de la autofagia (LC3-I/II y beclin-1) mediante WB. La línea celular CAL 27 mostró una autofagia constitutiva con la expresión de LC3-II, indicando la formación de autofagosomas, y una expresión de altos niveles de beclin-1, no observándose diferencias tras el tratamiento con EDLF (**Figura No 42, A**). Sin embargo, en la línea CAL 33 no se observó esta activación constitutiva, sino que se encontró la inducción de LC3-II y de la expresión de beclin-1 a partir de las 15 h de tratamiento (**Figura No 42, A**). La inhibición de autofagia por cloroquina y wortmanina en células CAL 27 induce de forma significativa por si sola apoptosis, sugiriendo que la autofagia constitutiva en células CAL 27 se comporta como un proceso de supervivencia para las células (**Figura No 42, B**). Sin embargo, esta inhibición de autofagia no afectaba al porcentaje de apoptosis presente en las células CAL 33, en el caso de wortmanina. El tratamiento con cloroquina en esta línea celular produce un aumento significativo en el porcentaje de apoptosis (**Figura No 42, B**), sugiriendo que en esta línea celular la autofagia podría ser un mecanismo de supervivencia. Además, el pretratamiento con cloroquina no afectó significativamente a la inducción de apoptosis por EDLF en ambas líneas celulares (**Figura No 42, B**). Sin embargo, en la línea celular CAL 33, el pretratamiento con wortmanina

aumento de forma significativa el porcentaje de apoptosis inducido por EDLF, sugiriendo que la autofagia podría estar participando en la resistencia en la apoptosis en esta línea celular.

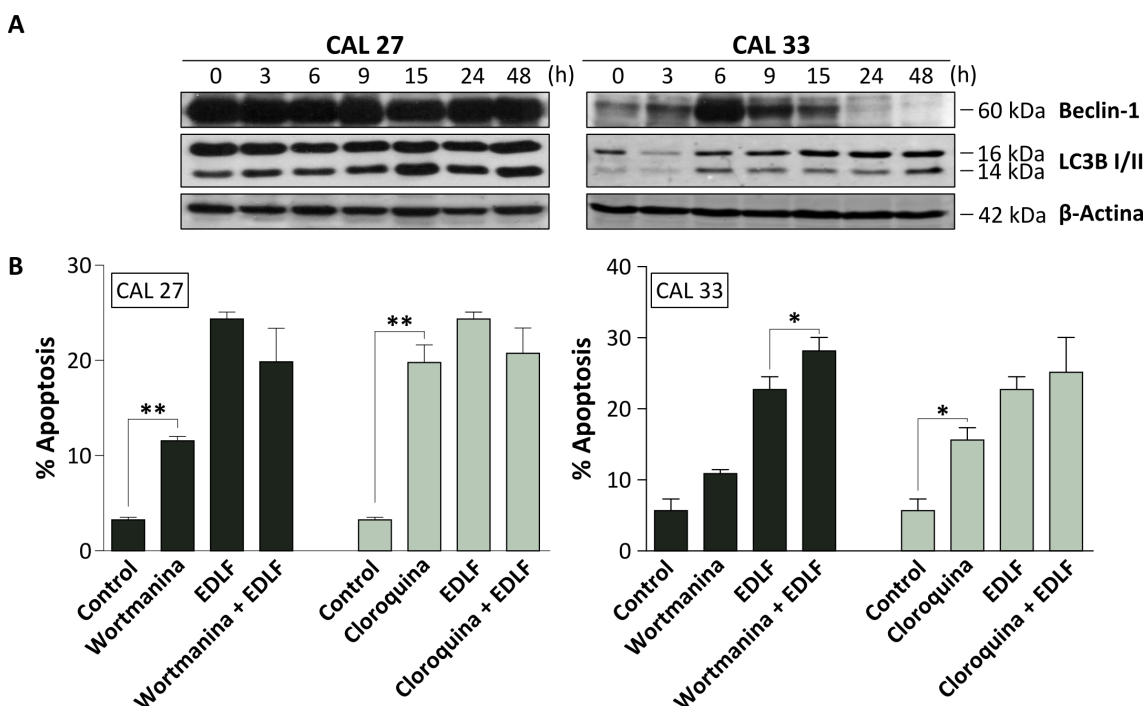


Figura No 42: Efecto de marcadores de autofagia en las líneas celulares de CCC por tratamiento con EDLF y efecto de sus inhibidores en la apoptosis: A. Se trataron las dos líneas celulares con las concentraciones respectivas de EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante los tiempos indicados. Posteriormente las células se lisaron y se obtuvieron los extractos proteicos para ser analizados por WB, con los anticuerpos correspondientes. **B.** Se trataron las dos líneas celulares de CCC con 30 μ M cloroquina durante 1 h. Posteriormente, las células se trataron con EDLF (10 μ M, CAL 27; 30 μ M, CAL 33) durante 24 h. La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados en esta figura corresponden a la media de tres experimentos diferentes \pm E.S. , ** $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

9. IMPLICACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL DE MEMBRANA EN LA INCORPORACIÓN DE EDLF Y POSTERIOR INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Se estudió la incorporación de EDLF marcada con tritio durante 1 h de tratamiento en ambas líneas celulares de CCC. Se observó que las dos líneas celulares incorporaron el compuesto radioactivo, siendo algo mayor en la línea CAL 27 (3500 pmol de [3 H]-EDLF/ 1×10^6 células) que en la línea CAL 33 (3000 pmol de [3 H]-EDLF/ 1×10^6 células) (**Figura No 43, B**)

Se evaluó igualmente, el efecto que tiene el colesterol en la membrana celular sobre la cantidad de [3 H]-EDLF incorporada a la célula. Para disminuir los niveles de colesterol de la membrana, las células se trataron previamente con m- β CD. Se encontró en las dos líneas celulares una reducción en la cantidad de [3 H]-EDLF incorporada (50% con respecto a las células control) (**Figura No 43, B**). De igual forma, la disminución de colesterol por m- β CD

produjo una reducción importante en el porcentaje de apoptosis (entre el 50 al 60% con respecto a las células tratadas solo con EDLF) (Figura No 43, C).

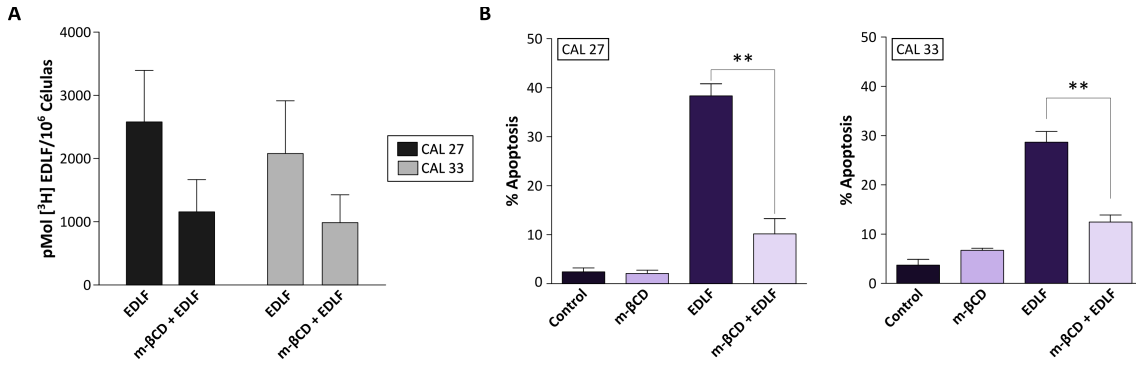


Figura No 43: Incorporación intracelular de EDLF y efecto de la depleción de colesterol en la membrana en la incorporación de EDLF y muerte celular en líneas celulares de CCC inducida por EDLF: A. Se estudió la incorporación de [³H]-EDLF en líneas celulares de CCC; se trataron las células con [³H]-EDLF a una concentración 10 μM durante 1 h. A continuación las células se lavaron exhaustivamente, se lisaron y se midió la cantidad de radiactividad en las células para cuantificar la incorporación de EDLF. Para las células tratadas con m-βCD, éstas se trataron durante 1 h a una concentración 2,5 mg/ml, antes de ser tratadas con EDLF marcada con tritio durante 1 h. B. Se estudió el efecto de la depleción de colesterol en la muerte celular inducida por EDLF mediante tratamiento previo con m-βCD como se ha indicado en A. Las células se fijaron y marcaron para el análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± E.S. **p<0.01 (Student's t-test).

DISCUSIÓN

SARCOMA DE EWING

I. IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA APOPTÓTICA EN EL SARCOMA DE EWING

El Sarcoma de Ewing es un tumor sólido que a pesar de no ser de los más frecuentes, es uno de los tumores más agresivos, especialmente cuando alcanza el estado metastásico, en el cual su tasa de supervivencia es menor del 20% (Lissat et al, 2012; Ludwig, 2008). Debido a esta agresividad, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para su tratamiento, para aumentar así la supervivencia de los pacientes (Kelleher & Thomas, 2012)

Actualmente la investigación biomédica se centra en la búsqueda de nuevos fármacos y mecanismos de acción mediante los cuales se pueda atacar de forma específica a la célula tumoral, ya sea para tratar tumores resistentes a los fármacos convencionales, como para encontrar nuevas dianas terapéuticas que potencien la actividad antitumoral (Lissat et al, 2012).

Diversos estudios han demostrado que el sarcoma de Ewing presenta una alta sensibilidad a la activación de la respuesta apoptótica, a través de los receptores de muerte, independientemente de su ligando, especialmente la familia de receptores TRAIL (DR4 y DR5) y Fas/CD95 (Garcia-Santos et al, 2012; Kontny et al, 2001; Kontny et al, 1998; Picarda et al, 2010).

Se ha descrito una familia de compuestos sintéticos derivados de la fosfatidilcolina que muestran propiedades antitumorales, conocidos en conjunto como lípidos antitumorales ATLS (Gajate & Mollinedo, 2002; van Blitterswijk & Verheij, 2008). En este sentido, se ha descrito en diferentes estudios de nuestro grupo que el principal mecanismo de acción de estos compuestos ATLS, especialmente para edelfosina y perifosina es la activación de la maquinaria apoptótica de la célula tumoral de forma bastante selectiva (Gajate et al, 2004; Gajate & Mollinedo, 2007; Mollinedo et al, 1997; Mollinedo et al, 2004), en particular mediante la activación del receptor de muerte Fas/CD95 independientemente de su ligando, una vez incorporado el ATL en la célula, por reclutamiento en los microdominios lipídicos de membrana “rafts”, activando la maquinaria apoptótica desde el interior de la célula tumoral. Este mecanismo de acción a través del reclutamiento de receptores de muerte, Fas/CD95 y receptores de TRAIL, en microdominios lipídicos de membrana “rafts” ha sido descrito como responsable de la acción antitumoral de edelfosina y perifosina en tumores hematológicos (Gajate et al, 2000a; Gajate & Mollinedo, 2001; Gajate & Mollinedo, 2002; Mollinedo et al, 2010a; Mollinedo et al, 2010b; Mollinedo & Gajate, 2006). Sin embargo, en el caso de tumores sólidos se ha demostrado que el mecanismo de acción principal de la EDLF se centra en el estrés de retículo endoplasmático y activación

posterior de la cascada de apoptosis a través de la mitocondria (Gajate et al; Nieto-Miguel et al, 2007; Nieto-Miguel et al, 2006)

II. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS ATLS EN SARCOMA DE EWING

Se realizó el estudio de la actividad citotóxica de diversos ATLS, edelfosina (EDLF), perifosina (PERIF), miltefosina (MILTEF) y erucilfosfocolina (ERPC) con el objetivo de determinar cuál de todos presentaba una mayor actividad en la inducción de muerte celular y profundizar así en su mecanismo de acción. Se encontró que la EDLF era el compuesto con mayor actividad citotóxica, seguido de la PERIF, ERPC y MILTEF (**Figura No 16, A**). Estos resultados coinciden con resultados previos en otros tumores sólidos (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007; van Blitterswijk & Verheij, 2013). Además, el tratamiento con EDLF en SE mostró una actividad apoptótica superior (40%-50% de apoptosis a las 24h de tratamiento) en comparación con otro tipo de células tumorales derivadas de tumores sólidos estudiados anteriormente en nuestro laboratorio (páncreas, cervico-uterina, pulmón) (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2006). Esta mayor sensibilidad a EDLF mostradas por el SE podría deberse en parte a la activación de la respuesta apoptótica a través de receptores de muerte, ya que este tumor se caracteriza por su sensibilidad a la apoptosis a través de esta ruta (Fulda et al, 2001; Kontny et al, 2001).

III. APOPTOSIS COMO MECANISMO PRINCIPAL DE MUERTE EN SARCOMA DE EWING INDUCIDA POR EDLF

En este estudio se comprobó que las líneas celulares de SE tratadas con EDLF morían por apoptosis. Los resultados que soportan esta conclusión son múltiples. En primer lugar, se demostró el aumento de la fase sub-G₁ de ciclo celular en el análisis mediante citometría de flujo, que muestra degradación del ADN característica del proceso final de apoptosis (**Figura No 17**). Por otra parte, se observó la activación de la caspasa-3 y la fragmentación de PARP como procesos característicos de la respuesta apoptótica (**Figura No 19, A y B**). Por último, se encontró la fragmentación del ADN internucleosomal por la técnica de *laddering* de DNA (**Figura No 18**). Otro resultado importante que reafirma la inducción de apoptosis es la disminución en el porcentaje de células en la fase sub-G₁ al emplear el inhibidor general de la familia de caspasas (z-VAD-fmk) a niveles cercanos a las células sin tratar. Es importante destacar que el inicio de la activación de la cascada apoptótica se presenta a tiempos cortos (entre 3 y 6 horas de tratamiento), mostrando una sensibilidad similar a los tumores hematológicos, y activándose más rápidamente que en otros tumores sólidos estudiados en nuestro grupo (Gajate et al, 2012; Gajate et al, 2000b; Nieto-Miguel et al, 2006).

IV. ACUMULACIÓN DE EDLF EN RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E INDUCCIÓN DE ESTRÉS DE RETÍCULO COMO PROCESO INICIAL DE LA RESPUESTA DE MUERTE EN SARCOMA DE EWING

Varios estudios han demostrado que para que la EDLF pueda llevar a cabo su actividad proapoptótica necesita en primer lugar entrar en la célula y acumularse en diferentes orgánulos (membrana plasmática, retículo endoplasmático y mitocondria) generando una disfunción en los mismos (Gajate et al, 2004; Mollinedo et al, 2010a; Mollinedo et al, 2011; Nieto-Miguel et al, 2007).

En este trabajo hemos encontrado que la edelfosina se localiza en el retículo endoplasmático de las células de sarcoma de Ewing, constituyendo así esta estructura subcelular una diana para la EDLF en este tumor. Estos resultados están de acuerdo con datos previos de nuestro grupo en los que se identificaba el RE como una de las dianas de la EDLF en diversas líneas celulares derivadas de tumores sólidos (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007; Nieto-Miguel et al, 2006). La acumulación de este agente antitumoral en el RE da lugar a la activación inicial de la UPR en respuesta al estrés generado. Posteriormente, la señalización por estrés persistente en la célula conlleva a la activación de la respuesta apoptótica ligada al RE, y en consecuencia la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis por señales enviadas directamente desde el RE a la mitocondria (este trabajo) (Gajate et al; Nieto-Miguel et al, 2007; Nieto-Miguel et al, 2006).

Se ha descrito que la generación de estrés de retículo endoplasmático favorece inicialmente la respuesta a proteínas mal plegadas, a través de la fosforilación de PERK y posterior fosforilación de eIF2 α (Shore et al, 2010; Tabas & Ron, 2011); esta activación inhibe la síntesis de proteínas para evitar su acumulación en el lumen del retículo y como respuesta compensatoria al estrés (ciclina D1 y arresto del ciclo celular), favoreciendo la supervivencia (Agostinis et al, 2012; Harr & Distelhorst, 2009). En nuestro estudio se encontró la fosforilación de eIF2 α a tiempos tempranos de tratamiento. Sin embargo, el hecho de que la incubación con EDLF inducía con el tiempo apoptosis en las células de sarcoma de Ewing sugiere que la respuesta compensatoria al estrés no sería lo suficientemente contundente para favorecer la supervivencia celular. Por lo tanto, la señal de estrés en el retículo prevalece favoreciendo la activación de la cascada apoptótica a través de esta misma vía de señalización.

Al estudiar GRP78, otra proteína implicada en la UPR, se encontró que está expresada de manera constitutiva en las dos líneas celulares. Se ha descrito que esta activación persistente de GRP78 es típica en tumores sólidos (Fu et al, 2007; Li & Lee, 2006; Luo & Lee, 2012). En estos tumores debido a las condiciones de alta proliferación, condiciones de hipoxia, falta de nutrientes y acidosis en el microambiente tumoral, se genera una situación de estrés por acumulación de proteínas mal plegadas, favoreciendo la activación de mecanismos de plegamiento de proteínas como la UPR (Kim et al, 2006; Luo & Lee, 2012; Rouschop et al, 2013).

Esta activación constitutiva en SE sugeriría un intento de la célula por contrarrestar estas condiciones de estrés favoreciendo la supervivencia celular. Sin embargo, esta expresión disminuye al tratar con EDLF, lo que indicaría que el proceso de plegamiento de proteínas por parte de GRP78 no es suficiente para contrarrestar el estrés en el retículo endoplasmático generado por EDLF. En esta situación se favorecería la señalización apoptótica frente a la de supervivencia. En este sentido, tras tratar con EDLF, se encontró un aumento en la expresión del factor de transcripción GADD153, que es uno de los indicadores de la activación de la apoptosis por estrés generado en el RE (McCullough et al, 2001; Oyadomari & Mori, 2004; Shore et al, 2010), lo que nos estaría demostrando nuevamente que la EDLF estaría generando estrés en la célula favoreciendo la muerte por apoptosis en SE, alterando el equilibrio entre supervivencia y estrés en el RE. La inducción de GADD153 proviene de la activación de las principales proteínas de la UPR (PERK-eIF2 α -ATF4)(Breckenridge et al, 2003a; Sano & Reed, 2013). Al evaluar la activación de eIF2 α en SE, se encontró su fosforilación tiempo antes de la inducción de GADD153. Esto sugeriría que la respuesta de supervivencia generada inicialmente por el eIF2 α no es suficiente para evitar el estrés por mal plegamiento de proteínas, por lo que eIF2 α cambiaría la inducción de la UPR hacia un proceso para favorecer la respuesta apoptótica mediante la inducción de GADD153. Por otro lado, GADD153 está relacionada con otras proteínas importantes en la señal apoptótica. Se ha descrito que GADD153 inhibe la transcripción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y es capaz de inducir la translocación de Bax desde el citosol a la mitocondria para activar la ruta intrínseca de la apoptosis (McCullough et al, 2001; Oyadomari & Mori, 2004). En este sentido, en SE se encontró la disminución de la expresión de Bcl-2 y la activación de Bax en un tiempo similar al de la inducción de GADD153, lo que sugeriría que GADD153 estaría actuando sobre estas proteínas de la familia Bcl-2 enlazando la respuesta apoptótica del RE con la activación de la apoptosis por la vía mitocondrial.

Se estudiaron igualmente las proteínas implicadas en la señalización apoptótica desde el RE. La caspasa-4 es la proteasa característica de la activación del proceso apoptótico mediado por estrés de RE (Breckenridge et al, 2003a; McIlwain et al, 2013; Olsson & Zhivotovsky, 2011). Varios estudios han sugerido que la activación de la caspasa-4 se debe principalmente a la liberación de calcio desde el lumen de RE al citoplasma en situaciones de estrés en este orgánulo, favoreciendo la fragmentación y activación de esta proteasa (Harr & Distelhorst, 2009; Salido, 2009). Una vez la caspasa-4 es activada, es la encargada de activar a la caspasa-9 para continuar el proceso proteolítico (McIlwain et al, 2013; Olsson & Zhivotovsky, 2011). En SE se encontró la activación de caspasa-4 tras el tratamiento con EDLF, y su inhibición con el inhibidor específico z-LEVD-fmk bloqueó la respuesta apoptótica, sugiriendo la participación del RE como orgánulo activador de la respuesta apoptótica en SE tras el tratamiento con EDLF. Así mismo se observó un aumento en la concentración de calcio en el citosol y la activación de caspasa-9 tras el tratamiento con EDLF. Estos resultados en su conjunto indicarían que el RE estaría participando en la apoptosis en SE. La activación de la respuesta apoptótica por estrés de

retículo endoplásmico en SE mostraría que este tumor tendría también las características de otros tumores sólidos al ser tratados con EDLF.

Por otra parte, Bap31, una proteína integral de la membrana del retículo endoplasmático, es fragmentada por la caspasa-8 dando lugar a su fragmento activo p20 en la membrana del RE, favoreciendo la liberación de calcio desde el lumen del retículo al citoplasma. Este calcio es incorporado a la mitocondria para producir la fisión de la mitocondria y la liberación del citocromo c (Breckenridge et al, 2003b; Verfaillie et al, 2012). Esta proteína p20-Bap31 constituye una de las conexiones más importantes en la respuesta apoptótica, generada por estrés en RE, entre el RE y la vía mitocondrial de la apoptosis, además de integrar la ruta extrínseca de la apoptosis con el RE y la mitocondria (Breckenridge et al, 2003b; Iwasawa et al, 2010). En SE se encontró que Bap31 es fragmentada tras el tratamiento con EDLF, lo que podría explicar la interconexión que existe entre el RE y la mitocondria en el proceso apoptótico, además que podría justificar el aumento en la concentración de calcio citosólico en las dos líneas celulares de SE. Por otra parte, esta proteína podría ser la interconexión que existe entre la respuesta mediada vía “rafts” lipídicos en SE y el retículo. Esta conexión entre rutas de señalización ya se ha descrito anteriormente en estudios previos y en otros tipos de tumores realizados en nuestro grupo (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007).

Otra de las proteínas importantes que participan en la activación de la respuesta apoptótica desde el retículo endoplasmático es la proteína proapoptótica Bax. Esta proteína puede ser activada por la JNK (previamente activada por señales de estrés). Bax es activada desde el citosol, para luego translocarse y oligomerizarse en la membrana del RE, cuyo fin es la apertura de poros que faciliten la liberación de calcio desde el lumen del retículo y facilitar la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis (Breckenridge et al, 2003a; Ghibelli & Diederich, 2010; Shore et al, 2010; Tsuruta et al, 2004). En SE se encontró que la proteína Bax es activada tras el tratamiento con EDLF, por lo que estaría contribuyendo al igual que Bap31 en la liberación de calcio desde el lumen del RE al citosol favoreciendo la intercomunicación entre el RE y la mitocondria en la activación de la respuesta apoptótica.

Como se describió anteriormente un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma es importante para la activación de la señal apoptótica desde el RE (Breckenridge et al, 2003a; Filadi et al, 2012; Salido, 2009). En SE se encontró un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma tras el tratamiento con EDLF. Al emplear el agente quelante BAPTA en las líneas celulares de SE, disminuyó significativamente la apoptosis inducida por EDLF. Este resultado podría apoyar que la conexión retículo endoplasmático-mitocondria es importante en el mecanismo de acción de EDLF en células de SE, y que además esta intercomunicación entre orgánulos está relacionada con el aumento en la concentración de calcio libre en el citoplasma.

Tomados en su conjunto, los resultados aquí descritos indican que el que el retículo endoplasmático cumple un papel fundamental en el mecanismo de acción de EDLF en el SE, ya que una vez la EDLF es incorporada en el orgánulo generaría estrés activando la respuesta a proteínas mal plegadas, la cual al no ser suficiente para compensar el estrés generado, se favorecería la activación de la respuesta apoptótica desde este orgánulo.

V. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE EDLF EN EL SARCOMA DE EWING

En trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se ha encontrado que la mitocondria participa activamente en el mecanismo de muerte de EDLF tanto en tumores hematológicos como sólidos, por activación de la ruta intrínseca de la apoptosis, así como centro principal de la producción masiva de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generando estrés general en la célula (Gajate & Mollinedo, 2007; Gajate et al, 2000b; Mollinedo et al, 2011; Reis-Sobreiro et al, 2013). Este mecanismo implica la generación de estrés oxidativo (producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)), y disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Esta disfunción mitocondrial produce la alteración en la homeostasis de las proteínas de la familia Bcl-2. Todos estos eventos en conjunto culminan con la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria y la formación del apoptosoma, cuya función principal es la activación de la caspasa-9 (Campello & Scorrano, 2009; Dakubo, 2010).

En células de SE se encontró que la EDLF induce la producción masiva de ROS, coincidiendo con el tiempo de activación de la cascada apoptótica por vía mitocondrial, que implica la pérdida de $\Delta\Psi_m$, activación de la proteína proapoptótica Bax, la disminución de los niveles de proteína Bcl-2, y la liberación del citocromo *c* al citosol. Estos resultados sugieren que la mitocondria estaría participando activamente en la respuesta apoptótica en este tumor y que esta activación estaría relacionada con el estrés generado en la misma. Además, estos resultados refuerzan los datos publicados por nuestro grupo en otro tipo de tumores tanto sólidos como hematológicos (Gajate et al, 2012; Gajate & Mollinedo, 2007; Gajate et al, 2000b).

La disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (despolarización) está relacionada con múltiples cambios funcionales en la mitocondria que llevan a la disfunción de este orgánulo y a activar la respuesta apoptótica, aumentando la permeabilidad de su membrana y favoreciendo la salida las proteínas implicadas en la formación del apoptosoma (Henry-Mowatt et al, 2004; Suski et al, 2012). En SE, se encontró a tiempos iniciales de tratamiento con EDLF una hiperpolarización transitoria de la membrana mitocondrial seguida de la despolarización de la misma con el tiempo. Esta hiperpolarización inicial del $\Delta\Psi_m$ se ha descrito en varias líneas celulares tumorales tras el tratamiento con diferentes compuestos a los

que se les atribuye actividad antitumoral, relacionándose con varios procesos. En primer lugar se ha atribuido a un aumento en la respiración mitocondrial y un aumento en el consumo de oxígeno para compensar la respuesta por estrés en este orgánulo (Cao et al, 2007). Por otra parte, se ha descrito como una inhibición de la F_0/F_1 -ATP sintasa de la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo una acumulación de protones en el espacio intermembrana de la mitocondria, dificultando así el acceso nuevamente de estos protones a la matriz. Esta inhibición trae como consecuencia un aumento en el pH de la membrana que se refleja en una hiperpolarización de la misma; y la inhibición de F_0/F_1 -ATP sintasa trae como consecuencia un aumento en la producción de las ROS (Matsuyama et al, 2000; Suski et al, 2012). Varios estudios demuestran que una de las principales señales de disfunción mitocondrial en varios tipos celulares implican una hiperpolarización transitoria de la membrana mitocondrial y un aumento masivo en la producción de las ROS, procesos que se han relacionado con la inducción de muerte celular por necrosis y necroptosis (Kanno et al, 2006; Skulachev, 2006; Vanden Berghe et al, 2010). Estas dos respuestas son características de la disfunción mitocondrial de la células (Dong et al, 2009). Es probable que en el SE el estrés generado por la EDLF en la mitocondria esté generando esta hiperpolarización de la membrana mitocondrial favoreciendo la activación de mecanismos de muerte alternativos. Por otra parte, la posterior despolarización de la membrana mitocondrial debida, al menos en parte, a la producción masiva de las ROS estaría favoreciendo la liberación del citocromo c y por lo tanto la activación de la apoptosis.

Las proteínas de la familia Bcl-2 participan activamente en la homeostasis mitocondrial, favoreciendo o impidiendo la muerte celular, especialmente en los casos de estrés celular (Campo, 2009; Cory & Adams, 2002; Dakubo, 2010). En este trabajo se evaluaron algunas de las proteínas proapoptóticas implicadas en estrés celular, como es el caso de la proteína Bax, cuya función principal es la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria por dimerización y así facilitar la salida del citocromo c (Westphal et al, 2011). En SE se encontró tanto la activación de Bax como la liberación del citocromo c tras el tratamiento con EDLF, lo que sugeriría que Bax estaría favoreciendo la apertura del poro de transición de permeabilidad facilitando la liberación del citocromo c.

Varios estudios indican que la proteína anti-apoptótica Bcl-2 es importante en el mantenimiento de la supervivencia ante señalización de estrés celular, principalmente formando complejos con la proteína Bax en el citosol, o uniéndose a la membrana del retículo endoplasmático o en la mitocondria para evitar la formación de poros y evitar la salida de calcio al citoplasma y prevenir así la activación de la apoptosis (Adams & Cory, 2007; Breckenridge et al, 2003a; Cory & Adams, 2002). En las líneas celulares de SE hay una disminución en la expresión de Bcl-2 tras el tratamiento con EDLF a partir de las 6 horas de incubación. Así, la activación de Bax unida a la disminución en los niveles de proteína Bcl-2 por acción de la EDLF en células de SE facilitarían la inducción de apoptosis.

Una de las últimas etapas en el proceso apoptótico a través de la ruta intrínseca de apoptosis es la activación de la caspasa-9 a partir de la formación del apoptosoma o por activación directa desde el retículo por activación de la caspasa-4 (Breckenridge et al, 2003a). En el presente trabajo se observó la activación de la caspasa-9 en SE tras el tratamiento con EDLF. La activación de esta caspasa coincide en el tiempo con la activación de la caspasa-4 y la liberación al citosol de citocromo *c*, lo que podría sugerir que en la activación de la caspasa-9 estuviesen implicados tanto el RE como la mitocondria.

Estos resultados sugieren que la mitocondria juega un papel fundamental en la respuesta apoptótica inducida por EDLF en células de SE, tanto por la transmisión y amplificación de la señalización que proviene del estrés de RE, como por la activación por si misma ante el estrés generado por las especies reactivas de oxígeno.

VI. IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EDLF EN CÉLULAS DE SARCOMA DE EWING

Los resultados presentados en este trabajo apuntan a que la especies reactivas de oxígeno estarían participando en la activación de rutas de señalización apoptótica tras el tratamiento con EDLF en células de SE. Una de las fuentes principales de la producción de ROS en el tratamiento con EDLF es la mitocondria (Gajate et al, 2000b). Esta producción de ROS en la mitocondria puede desencadenar una reacción en cadena que amplifica la producción de las mismas, causando daños en las membranas de los distintos orgánulos, produciendo la disfunción general de la célula y la activación de la cascada apoptótica. Esta acción de la EDLF sobre la generación de ROS e inducción de apoptosis se ha encontrado recientemente en nuestro laboratorio, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico (Cuesta-Marbán A. *et al.*, información en proceso de publicación). Por otra parte, se ha descrito que la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo favorece la producción de ROS, pero en menor proporción que la mitocondria (Veasey et al, 2009). Como se ha descrito en este trabajo, la inhibición de la producción de ROS, empleando agentes antioxidantes de origen lipófilo como el BHA, inhibió la apoptosis inducida por EDLF en células de SE. Esta disminución en la apoptosis indica la importancia que tiene la generación de ROS como mecanismo iniciador de la respuesta apoptótica de EDLF en el SE, y estas ROS podrían ocasionar la disfunción de los orgánulos, favoreciendo la activación de la respuesta apoptótica. Estos resultados están de acuerdo con otras publicaciones en las que se señala al estrés oxidativo como uno de los factores que favorecen la apoptosis de los ATLS en otras líneas tumorales (Rahmani et al, 2005; Selivanov et al, 2010; Wagner et al, 1998).

VII. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE LAS MAPKS EN EL MECANISMO DE MUERTE INDUCIDO POR EDLF EN CÉLULAS DE SARCOMA DE EWING

Dentro de los mecanismos de evasión de la muerte celular por parte de las células tumorales esta la sobreexpresión de rutas de señalización encargadas de la proliferación y supervivencia celular. Las principales rutas de señalización implicadas en este proceso son la ruta de las MAPKs y la ruta de PI3K/Akt (Carnero et al, 2008; Kim & Choi, 2010). En SE se ha encontrado que estas rutas de señalización están sobreexpresadas por causa de la activación constitutiva del receptor tirosina quinasa IGFR-1 (Karosas, 2010; Kelleher & Thomas, 2012; Ludwig, 2008; Subbiah et al, 2009). Estudios publicados recientemente describen que los ATLS EDLF y PERIF son capaces de inhibir la señalización de la ruta PI3K/Akt por desacoplamiento de la proteína Akt de la membrana celular, impidiendo su fosforilación por parte de PDK-1 y otras quinasas (Elrod et al, 2007; Meuillet, 2011; Reis-Sobreiro et al, 2013; Ruitter et al, 2003; van Blitterswijk & Verheij, 2013; Yao et al, 2013). En el caso de las MAPKs se ha descrito que estos ATLS participan en la activación de las MAPKs relacionadas con estrés celular, es el caso de JNK y Erk en algunos casos (Chiarini et al, 2008; Gajate et al, 2012; Gajate et al, 1998; Nieto-Miguel et al, 2007; Tewari et al, 2008). Experimentos preliminares sugieren que EDLF inhibe la fosforilación de Akt (Bonilla X et al., observaciones no publicadas) en células de SE, sin embargo los estudios de este trabajo se centraron en el papel de las MAPKs JNK y Erk en la acción apoptótica de EDLF en este tipo de tumor.

La cascada de señalización de las MAPKs está implicada en respuestas de proliferación y muerte celular dependiendo del tipo de estímulo recibido (Cagnol et al, 2006; Kim & Choi, 2010). Una de las quinasas de esta familia JNK, cuando su activación es persistente en el tiempo, participa en la activación de la respuesta apoptótica ante el estrés celular (Dong et al, 2009). A nivel mitocondrial la activación de esta quinasa se produce por el aumento de las ROS generadas en este orgánulo, activando inicialmente a la quinasa ASK-1 que fosforila a JNK para iniciar la activación de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, iniciándose así la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis (Tsuruta et al, 2004).

Una de las proteínas centrales en el proceso apoptótico generado por EDLF es la JNK que bajo condiciones de estrés celular es fosforilada de manera persistente para activar múltiples rutas de señalización a nivel de RE y mitocondria y dar inicio a la muerte de la célula tumoral (Gajate et al, 1998; Nieto-Miguel et al, 2007; van Blitterswijk & Verheij, 2013). En células de SE se encontró la activación persistente de esta quinasa a tiempos tempranos de tratamiento con EDLF, siendo uno de los primeros marcadores de estrés celular junto con el aumento en la producción de las ROS y el reclutamiento del receptor de muerte Fas/CD95 en los microdominios lipídicos "rafts". En este sentido, es tentador sugerir que JNK podría estar

implicada en la interconexión de las diferentes señales apoptóticas transmitidas desde el RE, la mitocondria y la membrana celular ante el estrés generado en la célula.

Se ha descrito que la fosforilación de JNK es dependiente de la fosforilación de ASK-1; esta última es activada en procesos relacionados con estrés oxidativo (Circu & Aw, 2010; Runchel et al, 2010). Dependiendo de la intensidad y el tiempo de fosforilación de JNK puede dar lugar a respuestas celulares diferentes, ya sea proliferación o apoptosis. En el caso de una fosforilación mantenida y marcada se ha relacionado la fosforilación de JNK con procesos de muerte celular (Bogoyevitch et al, 2010; Weston & Davis, 2007). En el caso de células de SE tratadas con EDLF, la fosforilación de JNK es marcada y persistente en el tiempo. Estas características son típicas de la inducción de apoptosis por estrés oxidativo mediada por ASK-1, lo que sugeriría que el estrés oxidativo es uno de los primeros eventos que suceden en la activación de la apoptosis, y por esta razón JNK podría ser activada a partir de ASK-1. En otros estudios realizados en nuestro grupo se ha descrito que en tumores sólidos la activación de JNK es dependiente de ASK-1 (Nieto-Miguel et al, 2007).

Por otra parte, se ha relacionado la activación de JNK con la translocación de la proteína proapoptótica Bax del citosol a la membrana mitocondrial para facilitar la salida del citocromo c (Tsuruta et al, 2004; Weston & Davis, 2007). En las líneas celulares de SE hay activación de Bax a partir de las 3 h de tratamiento, coincidiendo con el tiempo de activación de JNK, por lo que en este sentido la activación de JNK estaría mediando igualmente la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis. Esta activación de Bax a partir de JNK se ha descrito en trabajos realizados en nuestro laboratorio en otros tumores sólidos (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007).

Otra de las señales por las cuales JNK puede ser activada es por el estrés de RE, a través de la activación de IRE1 α que termina en la activación de JNK a través de ASK-1 (Verfaillie et al, 2013; Verfaillie et al, 2012). Ya se ha discutido que el estrés en RE es importante en el mecanismo de acción de EDLF en el SE, lo que sugeriría que el RE estaría participando igualmente en la activación de JNK para desencadenar la respuesta apoptótica.

Varios estudios han demostrado que la proteína implicada en supervivencia Akt está interrelacionada con las MAPK implicadas en estrés celular p38-MAPK y JNK por inhibición de ASK-1 (Franke et al, 2003). Por otra parte, varios estudios han demostrado que los ATLS son capaces de inhibir la fosforilación de Akt en la membrana celular en diferentes tipos de tumores (Elrod et al, 2007; Gills & Dennis, 2009; Reis-Sobreiro et al, 2013), y de esta forma la inhibición de Akt favorecería la activación de ASK-1 y por lo tanto la activación de JNK. En este sentido, en el caso de SE podría darse el caso de que la inhibición de Akt esté jugando un papel en la activación de JNK favoreciendo la respuesta apoptótica, ya que los resultados obtenidos (este trabajo y Bonilla, F. et al., observaciones no publicadas) parecen indicar una inhibición de Akt simultáneamente con una activación de JNK a tiempos tempranos de la incubación con EDLF).

Se ha descrito que otra de las proteínas de la familia de las MAPKs, Erk, participa principalmente en procesos de proliferación celular y en el caso de células tumorales puede ser una de las principales quinasas implicadas en la progresión tumoral. Sin embargo, en casos específicos se ha relacionado a Erk en procesos de muerte celular, esta activación se ha relacionado con la producción masiva de las ROS (Cagnol & Chambard, 2010). De la misma manera, se ha asociado la activación de Erk con procesos directamente relacionados con la ruta intrínseca de la apoptosis, afectando la función mitocondrial (disminuyendo la respiración mitocondrial y despolarizando la membrana mitocondrial) y en consecuencia participando en la regulación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-9 (Kim et al, 2003; Park et al, 2005; Zhang et al, 2003). Existen otros estudios que relacionan a la activación de Erk con la ruta extrínseca de la apoptosis, en concreto con la activación de los receptores de muerte y la activación de la caspasa-8 (Cagnol et al, 2006; Martin et al, 2006). En SE se encontró que esta quinasa no se encuentra fosforilada de forma constitutiva, lo que sugeriría que en este caso Erk no estaría participando en la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, tras tratar con EDLF se encontró una activación temprana y persistente en las dos líneas celulares de SE analizadas. La inhibición de Erk produjo una ligera disminución en la apoptosis, pero dicha inhibición no fue significativa, por lo que el efecto de EDLF sobre la activación de Erk no parece jugar un papel clave en la acción proapoptótica de EDLF en células de SE. Estos resultados podrían sugerir que en SE la activación de Erk se deba como una respuesta de estrés, pero no es suficiente para influir de forma significativa en la actividad proapoptótica de EDLF en células de SE. Algunos estudios previos implican a la activación de Erk en la respuesta celular a los ATLs, dependiendo ésta del tipo celular (Gills & Dennis, 2009; Reis-Sobreiro et al, 2013; Tewari et al, 2008).

VIII. MICRODOMINIOS LIPÍDICOS DE MEMBRANA “RAFTS” EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE EDLF EN CÉLULAS DE SARCOMA DE EWING

Son varios los estudios que relacionan a los ATLs con su efecto sobre los microdominios lipídicos de membrana “rafts”, especialmente en tumores hematológicos; y su implicación en el reclutamiento y desplazamiento de proteínas importantes en la transducción de señales tanto de muerte como de supervivencia, además de rutas de señalización implicadas en estrés celular (Beneteau et al, 2008; Gajate et al, 2004; Gajate et al, 2009; Gajate & Mollinedo, 2001; Gajate & Mollinedo, 2007; Mollinedo et al, 2010a; Reis-Sobreiro et al, 2013; van Blitterswijk & Verheij, 2013). Debido a la alta sensibilidad que presentaban las células de SE a la EDLF, en comparación con otro tipo de tumores sólidos ya evaluados en nuestro grupo, se decidió estudiar el papel de estas balsas lipídicas en el mecanismo de acción de EDLF en la inducción de apoptosis en células

de SE. Como se ha indicado anteriormente, el SE se caracteriza por su sensibilidad a sufrir apoptosis a través de receptores de muerte.

En este trabajo se encontró que el colesterol es importante para el mecanismo de acción de EDLF en la inducción de apoptosis en células de SE, ya que al eliminarse de la membrana por acción de la m- β CD se redujo la incorporación de EDLF y la respuesta apoptótica. Además, el tratamiento de células de SE con EDLF indujo un reclutamiento de las moléculas proapoptóticas Fas/CD95, DR4, FADD y JNK a los dominios de membrana "rafts", sugiriéndose que dominios de membrana "rafts" enriquecidos en colesterol podrían participar en la respuesta apoptótica de EDLF en este tumor de SE, si bien estudios adicionales son necesarios para determinar de forma concluyente el papel real de estos dominios de membrana en la acción de EDLF en este tipo de cáncer.

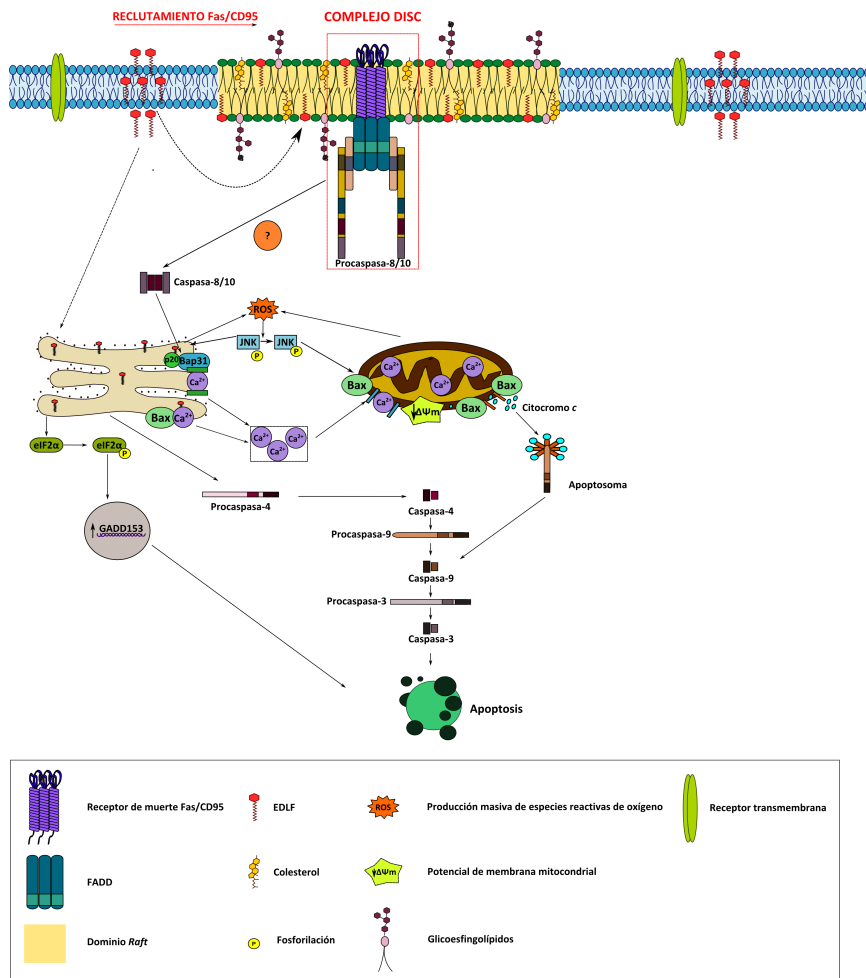


Figura Nº 44: Esquema de un posible modelo para el mecanismo de acción de EDLF sobre células de SE: Se describe un posible modelo del mecanismo de acción de la EDLF en la inducción de apoptosis en células de SE. Tras su incorporación en la célula, EDLF se acumula en el retículo endoplasmático, induciendo un estrés de retículo y una señalización apoptótica que implica procesos generados a través del retículo endoplasmático y la mitocondria. Para mayor información, véase el texto.

IX. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* DE EDLF EN SARCOMA DE EWING

Tomados en su conjunto los resultados aquí descritos sugieren que la EDLF muestra un potencial importante para el tratamiento del SE, y un posible modelo de su mecanismo de acción se muestra en la **Figura Nº 44**. En estudios *in vivo* se demostró la actividad antitumoral de la EDLF en un modelo de xenotransplante de la línea celular CADO ES-1 en ratones SCID. Tras el tratamiento oral con EDLF durante 21 días, se encontró una reducción significativa del tumor con respecto a los animales control tratados solo con vehículo. Por otra parte, se comprobó la agresividad de este tipo de tumores en este modelo *in vivo*, ya que algunos animales control presentaron signos de metástasis en hueso (datos no mostrados) y tumores con importantes indicios de neovascularización, mientras que este tipo de signos eran altamente reducidos en los animales tratados con EDLF. Además, por simple observación anatómica se apreció una alta reducción en la vascularización de los tumores. Estos datos están de acuerdo con observaciones previas que indican un efecto anti-angiogénico de los ATs (Gajate et al, 2012; Zerp et al, 2008).

Un aspecto importante de este estudio es el hecho que los resultados de señalización apoptótica obtenidos en estudios *in vitro* eran extrapolables al modelo *in vivo*. Al realizar la inmunohistoquímica de secciones de los tumores extraídos, se encontró la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del núcleo en la tinción con hematoxilina-eosina, lo que indicaría que el mecanismo de muerte de la EDLF en los tumores *in vivo* es la apoptosis. De la misma manera, se encontró la inducción en la expresión del factor de transcripción GADD153 en los tumores, lo que sugeriría la importancia que tiene el retículo endoplasmático en la activación de la cascada apoptótica por EDLF en el modelo *in vivo*. Además, se encontró una disminución en el marcaje de Ki67, que mostraría los efectos inhibitorios de la EDLF sobre la proliferación celular. La observación de los animales, así como de los órganos post-mortem, indicó que los animales tratados con EDLF no presentaban signos aparentes de toxicidad. Además, se determinó que la EDLF, administrada oralmente, era capaz de llegar y acumularse al tumor en cantidades significativas. De esta forma, estos resultados en un modelo de xenotransplante demuestran la actividad antitumoral de la EDLF *in vivo* frente a SE, y muestran el potencial antitumoral que tiene la EDLF en este tipo de tumor.

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Los tumores de cabeza y cuello se caracterizan por emplear múltiples mecanismos para evadir la respuesta apoptótica, entre estos mecanismos se encuentran la sobreexpresión de receptores tirosina quinasa (EGFR y VEGF principalmente) que implican la activación de rutas de supervivencia como la ruta de PI3K/Akt (Freudlsperger et al, 2010; Kalyankrishna & Grandis, 2006). Se han encontrado igualmente deleciones de genes o mutaciones que resultan en la pérdida de las dos copias del receptor de muerte TRAIL, mutaciones en la caspasa-8 y sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Fulda, 2009; Igney & Krammer, 2002), entre otros mecanismos, que hacen que sea considerado como uno de los tumores con alto índice de resistencia a la terapia actual. Esta es una de las razones principales por la que se decidió estudiar el efecto que tienen los ATLS en este tipo de tumor y si esta clase de compuestos son capaces de activar la respuesta apoptótica y causar la muerte de las células tumorales como nuevo mecanismo de acción en el tratamiento de estos tumores sólidos.

I. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE LOS ATLS EN LÍNEAS CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Inicialmente se evaluó la actividad proapoptótica de varios ATLS (EDLF, PERIF, MILTEF, ERPC) sobre dos líneas celulares de CCC, CAL 27 y CAL 33. Los resultados aquí descritos indicaron que la EDLF presentó mayor actividad proapoptótica, seguido de la PERIF, MILTEF y por último la ERPC. Al analizar los porcentajes de apoptosis inducidos por EDLF (10 μ M en CAL 27 y 30 μ M en CAL 33), se encontró que estos no sobrepasaban el 30% tras el tratamiento. Al comparar estos porcentajes de apoptosis con el de otros tumores de tipo sólido estudiados en nuestro laboratorio (Nieto-Miguel et al, 2006), se encontró que las líneas celulares de CCC presentan menor sensibilidad a sufrir apoptosis tras su incubación con EDLF, especialmente la línea celular CAL 33. Este resultado podría implicar la presencia de mecanismos de resistencia a la apoptosis y/o la presencia de mecanismos alternativos de muerte, ya que los ensayos de videomicroscopía indicaban que la mayoría de las células resultaban afectadas por el tratamiento con EDLF en un porcentaje muy superior al obtenido al analizar células apoptóticas.

Por otra parte, al tratar las células con los ATLS menos activos, se encontró que a concentraciones de 10 μ M de estos ATLS, las células presentaban una parada en la fase G₂/M. Esta parada en G₂/M se ha descrito en otras células derivadas de tumores sólidos tratados con EDLF y se ha relacionado con la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina (Nieto-Miguel et al, 2006) y la desregulación de la síntesis de colesterol (Ríos-Marco et al, 2013). En el mismo

sentido, a estas concentraciones se observó una disminución en la proliferación de las células (datos no mostrados, **y vídeo N° 4, Anexo N° 1**). Es interesante destacar que durante el tiempo de tratamiento con los diferentes ATIs, se observó por microscopía óptica la aparición de vacuolas en el citoplasma en las dos líneas celulares de CCC (**vídeo N° 2 y 4, Anexo N° 1**) y datos no mostrados). Se ha descrito que la aparición de estas vacuolas, dependiendo de su contenido, puede estar relacionado con mecanismos de autofagia u otros tipos de muerte celular (Ling et al, 2011).

II. IMPORTANCIA DE LA INCORPORACIÓN DE EDLF Y SU ACUMULACIÓN EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

De acuerdo a trabajos publicados por diferentes grupos, se determinó la importancia que tiene la incorporación y acumulación de la EDLF en su mecanismo de acción (Gajate et al, 2004; Gajate et al, 2000a; Mollinedo et al, 1997; Vink et al, 2007). Esta acumulación es el factor desencadenante de una serie de eventos que favorecen la activación de la señalización de muerte en la célula tumoral. En este trabajo, se encontró que la EDLF es capaz de incorporarse en grandes cantidades en la célula tumoral de CCC. De la misma manera, se encontró, mediante los estudios de localización subcelular del análogo fluorescente de EDLF (Et-BDP-ET), que este compuesto se acumula en el retículo endoplasmático de células de CCC. Este proceso de incorporación de la EDLF en la célula tumoral parece ser el primer evento en su mecanismo de acción, ya que se encontró que la incorporación de EDLF en cantidades significativas en la célula de CCC se producía rápidamente, tras tan solo una hora de tratamiento, y a partir de las 6 h se detectaba el inicio a la respuesta apoptótica. De la misma manera se encontró que la incorporación es importante para que pueda desencadenarse la respuesta de muerte, ya que al eliminar el colesterol de la membrana plasmática tras el tratamiento con m- β CD, se redujo tanto la incorporación de la EDLF a la célula como la apoptosis. Este resultado confirmaría otros estudios en los que se describe la importancia del colesterol en la membrana para que se lleven a cabo los procesos de incorporación y de muerte celular inducidos por EDLF (Mollinedo et al, 2010a; Mollinedo et al, 1997; Nieto-Miguel et al, 2007). Sin embargo, aunque la incorporación de EDLF a la célula tumoral es crítica para su acción proapoptótica, no hay una perfecta correlación entre el grado de incorporación de EDLF y la sensibilidad a la muerte celular por apoptosis, ya que las líneas celulares de CCC incorporan cantidades importantes de EDLF en comparación otros tumores sólidos que presentan una mayor sensibilidad a la EDLF, como por ejemplo sarcoma de Ewing (este trabajo).

III. PAPEL DE LAS ROS Y DE JNK EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE EDLF EN CCC

Se ha relacionado la acumulación de la EDLF en los diferentes orgánulos como una de las razones principales por las que se puede generar estrés en la célula (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007; Vink et al, 2007). Este estrés es originado principalmente por la producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provienen principalmente de la mitocondria y del retículo endoplásmico (Mollinedo et al, 2011; Reis-Sobreiro et al, 2013; Selivanov et al, 2010). Al estudiar la producción de las ROS en las líneas celulares de CCC, se encontró una producción masiva de estas especies reactivas tras el tratamiento con EDLF. De la misma manera, al emplear un antioxidante de tipo liposoluble (BHA) se observó una reducción en el porcentaje de apoptosis, que indicaría la importancia que tienen las ROS en el mecanismo de muerte de EDLF, como mecanismo iniciador de la activación de múltiples rutas de señalización. Se ha descrito que la producción masiva de las ROS puede estar implicada en la activación de varios tipos de muerte celular, tales como apoptosis, necrosis y autofagia (Circu & Aw, 2010; Choi et al, 2009; Dewaele et al, 2010; Dong et al, 2009; Li et al, 2011; Morgan et al, 2008).

Uno de los principales marcadores de estrés celular es la activación de la proteína perteneciente a la familia de las MAPKs JNK, la cual es fosforilada bajo estas condiciones (Dong et al, 2009; Kim & Choi, 2010; Mehan et al, 2011). En CCC se encontró la activación persistente de JNK tras el tratamiento con EDLF. De la misma manera, se encontró que la activación de JNK es importante para la activación de la apoptosis, ya que al ser inhibida se presentó una disminución significativa de la apoptosis. Estos resultados indican que JNK es clave en la activación de la respuesta de muerte inducida por EDLF en CCC. Se ha descrito que esta proteína participa en la amplificación de las ROS provenientes de la mitocondria (Chambers & LoGrasso, 2011). En este caso es posible que la JNK esté participando en este proceso de amplificación, ya que los tiempos en los que se presenta mayor producción de ROS coinciden con los tiempos de activación de JNK en las dos líneas. Por otra parte, se ha descrito que la activación de JNK está implicada en la liberación de calcio al citosol (Morgan et al, 2007), y en células de CCC se encontró un aumento en la concentración de calcio en el citosol tras el tratamiento con EDLF.

IV. IMPLICACIÓN DE LA CASCADA APOPTÓTICA EN EL MECANISMO DE MUERTE DE CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO TRAS TRATAMIENTO CON EDLF

Se estudiaron los principales marcadores de la apoptosis en CCC con el objetivo de determinar si este tumor sólido presentaba este mecanismo de muerte tras el tratamiento con EDLF al igual que otros tumores sólidos estudiados anteriormente en nuestro grupo (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007; Nieto-Miguel et al, 2006). Se encontró la activación de las caspasas-3 y -7, al igual que la fragmentación de su sustrato PARP. Al comparar con otro tipo de tumores estudiados, el tiempo de activación de la apoptosis tras el tratamiento con EDLF es tardío. Esta activación sugiere la presencia de mecanismos alternativos que puedan estar

retardando la activación de esta ruta de muerte. Por otra parte, se encontró que al inhibir estas caspasas se redujo significativamente el porcentaje de apoptosis, lo que indica que la apoptosis está implicada en el proceso de muerte de las líneas celulares de CCC, aunque no fuese de manera mayoritaria, ya que los estudios de videomicroscopía indicaban una alteración generalizada en las células tumorales. Partiendo de este resultado, se decidió profundizar en el mecanismo de activación de la cascada apoptótica en las líneas celulares de CCC.

V. PAPEL DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN EL PROCESO APOPTÓTICO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Este trabajo muestra que la EDLF se acumula en el RE de las líneas de CCC, induciéndose una respuesta de estrés de RE. Se encontró un incremento en los niveles de proteína de GADD153 y en la fosforilación de eIF2 α a partir de las 3 h de tratamiento. Sin embargo, esta respuesta no es tan intensa y persistente como se ha observado en otras líneas celulares en las que el RE constituye una parte fundamental del proceso apoptótico inducido por EDLF (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007). De todas formas, el tratamiento de células de CCC con EDLF indujo la activación de caspasa-4, y la inhibición específica de esta caspasa bloqueó la respuesta apoptótica inducida por EDLF. Estos resultados en su conjunto indican que la inducción de apoptosis por parte de EDLF en células de CCC es debido a su acumulación en el RE y al estrés de RE generado.

VI. FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EDLF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El tratamiento de células de CCC con EDLF indujo un aumento masivo de las ROS, así como cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Se ha descrito que la producción masiva de ROS desde la mitocondria es el factor común de múltiples respuestas de muerte, tanto en apoptosis como en necrosis y autofagia (Jain et al, 2013). Durante el presente estudio se encontró un aumento inicial en el potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con EDLF. Se ha descrito que este aumento es característico de eventos necróticos debido a la acumulación de protones H⁺ en el espacio intermembranal de la mitocondria (Choi et al, 2009). Esta acumulación es debida a la inhibición de la translocasa de nucleótidos de adenina (TNA) (que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria), produciendo así una disminución en la concentración de ADP en la matriz mitocondrial. Esto conlleva a un aumento de la hidrólisis de ATP por parte de la F₀/F₁-ATP sintasa, causando la hidrólisis del ATP, lo que tiene como consecuencia la protrusión de protones desde el interior de la mitocondria, produciendo así la repolarización de la membrana de la misma (Vanden Berghe et al, 2010; Vandenabeele et

al, 2010). La hiperpolarización de la membrana en las células de CCC podría deberse a la activación de procesos necróticos debido al estrés en la mitocondria al ser tratadas con EDLF, ya que RIP-1, proteína clave en el proceso necroptótico, inhibe TNA, pudiéndose así activar un mecanismo paralelo a la muerte celular por apoptosis. Tras el aumento inicial en el $\Delta\Psi_m$ se presentó una disminución del mismo a tiempos posteriores de tratamiento con EDLF, lo que indica una disfunción generalizada de la mitocondria que termina con la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de proteínas activadoras de la apoptosis.

Al evaluar el papel que cumple la mitocondria en el proceso apoptótico por EDLF en las líneas celulares de CCC, se encontró que la caspasa-9 se activa a tiempos muy tempranos de tratamiento, aparentemente antes que la caspasa-4. Este orden de activación de caspasas podría sugerir que procesos mitocondriales podrían ser uno de los primeros eventos afectados por EDLF, o al menos simultáneos con los inducidos en el retículo endoplasmático, en células de CCC, activando la ruta intrínseca de la apoptosis. Por otra parte, se encontró que en el mismo tiempo de tratamiento, hay liberación del citocromo *c* al citosol. Estos resultados mostrarían la participación de la ruta intrínseca de la apoptosis en el proceso de muerte por apoptosis de las líneas celulares de CCC. Sin embargo, varios estudios han mostrado que se puede presentar la liberación del citocromo *c* de manera independiente a la activación de la apoptosis, esto en el caso de la necroptosis, donde RIP-1 induce la disfunción mitocondrial favoreciendo la liberación del citocromo *c* (Tischner et al, 2012; Ye et al, 2012). Como en este trabajo se ha mostrado que EDLF induce también una respuesta necrótica en células de CCC, es posible que en este tumor la EDLF esté favoreciendo la liberación del citocromo *c* por activación tanto de la respuesta apoptótica como la necroptótica. EDLF induce la activación de Bax, proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, en células CAL 27, lo que podría estar favoreciendo la liberación del citocromo *c* por la apertura del poro mitocondrial en el caso de la apoptosis. Sin embargo, se ha descrito que Bax también puede participar en la muerte celular independiente de caspasas, favoreciendo la liberación tanto del citocromo *c* como de AIF (*apoptosis inducing factor*) al citosol (Capon et al, 2011; Delavallee et al, 2011)

VII. LIBERACIÓN DE CALCIO EN LA ACCIÓN DE EDLF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El aumento en la concentración de calcio citosólico está involucrado en múltiples procesos de muerte celular. En la apoptosis participa como interconexión entre el RE y la mitocondria para la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis (Breckenridge et al, 2003a; Filadi et al, 2012). En el caso de la necrosis se ha descrito que la sobrecarga de calcio en el citoplasma permite la entrada masiva de calcio a la mitocondria. Este aumento en el calcio

mitocondrial favorece la producción de las ROS, lo que conduce a la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) y la liberación de proteínas de muerte (Rasola & Bernardi, 2011; Zhivotovsky & Orrenius, 2011). En las líneas celulares de CCC se encontró el aumento significativo de la concentración de calcio citosólico a través del tiempo de tratamiento con EDLF. Este proceso podría ser importante en el mecanismo de muerte de EDLF en CCC, ya que puede estar favoreciendo la activación simultánea de varias rutas de muerte. En estudios anteriores se ha descrito las variaciones en las concentraciones de calcio citosólico generado por la EDLF en otros tumores sólidos y su relación con la apoptosis (Gajate et al, 2012; Nieto-Miguel et al, 2007). Al evaluar el efecto del calcio liberado sobre la apoptosis, mediante el quelante de calcio citoplasmático BAPTA-AM, se encontró una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis, lo que sugiere que la liberación de calcio libre al citosol juega un papel importante en la inducción de apoptosis en células de CCC por EDLF. A su vez sería interesante analizar como la inhibición de la liberación de calcio afecta a otros procesos de muerte celular, como necrosis o autofagia.

VIII. DISTINTOS TIPOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR EDLF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las líneas celulares de CCC pueden presentar más de un tipo de muerte celular tras el tratamiento con EDLF. Se encontró que las células de CCC tratadas con EDLF incorporaban yoduro de propidio (IP) y *Trypan blue*, indicando la inducción de procesos de muerte que implican la permeabilización de la membrana plasmática (Berghe et al, 2009). El hecho que las células sean capaces de incorporar IP, puede relacionarse con eventos necróticos, lo que explicaría la morfología celular observada en los ensayos de videomicroscopía (**Video Nº 2 y 4, Anexo Nº 1**). Al emplear el inhibidor específico de la necroptosis necrostatina-1 (inhibidor de RIP-1) disminuyó la cantidad de IP incorporada a la célula, y se incrementó el porcentaje de células que mueren por apoptosis en las dos líneas celulares. Por otra parte, al usar inhibidores específicos de la familia de caspasas (z-VAD-fmk) se observó una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis, favoreciéndose la activación de la respuesta necrótica, y aumentado así el porcentaje de células que incorporan IP; este cambio fue más significativo en la línea celular CAL 33. Estos efectos indican que las células recurren a otros mecanismos de muerte en respuesta al estrés generado por la EDLF por inhibición de la apoptosis y/o necroptosis, y que estos tipos de muerte se relacionan entre sí. Esta relación entre distintos tipos de muerte se ha descrito para otro tipo de compuestos con actividad antitumoral, tales como cisplatino (Sancho-Martínez et al, 2011). Este es un resultado preliminar que apunta a la presencia de necrosis por tratamiento de EDLF en células de CCC.

Como se describió al inicio de este capítulo, al tratar las células con EDLF y observar por microscopía óptica a tiempos iniciales de tratamiento, se apreció la aparición de vacuolas en el citoplasma, especialmente en la línea CAL 33. Para determinar con mayor exactitud en que momento y de qué manera influye la aparición de estas vacuolas en el proceso de muerte de estas líneas celulares, se realizó un análisis de videomicroscopía por *time-lapse* durante 24 h de tratamiento. En este caso se encontró la formación de vacuolas en el citoplasma a tiempos iniciales de tratamiento en las dos líneas celulares estudiadas de CCC, especialmente en la línea CAL 33 (**video Nº 4, Anexo Nº 1**). Se observó que esta vacuolización está relacionada de manera proporcional con la resistencia a la muerte celular por apoptosis. En este vídeo se encontró igualmente que muchas de las células que mueren, presentan las características morfológicas de la apoptosis: burbujeo de la membrana (*blebbing...*), formación de cuerpo apoptóticos, etc. La presencia de células apoptóticas fue más notoria en el caso de la línea celular CAL 27. Por otra parte, algunas de las células tratadas presentaron las características morfológicas típicas de necrosis, aumento en el volumen celular, hinchamiento de los orgánulos y ruptura de la membrana celular que facilita la salida del contenido celular. Estas características coinciden con los resultados de incorporación de IP, concluyendo que en estas líneas celulares hay un porcentaje de células que mueren por eventos necróticos y otro porcentaje que mueren por activación de la cascada apoptótica. En el caso de la línea CAL 33, se observó que durante las primeras horas de tratamiento (6-9 h) la formación masiva de vacuolas en el citoplasma, algunas de estas células entran en apoptosis, otras se mantienen vivas, y algunas presentan características de células necróticas. Es posible que esta línea celular esté entrando en un proceso inicial de autofagia como mecanismo de resistencia y posteriormente superen este tipo de citoprotección generado por el estrés y sean capaces de morir ya sea por apoptosis o por necrosis. De la misma manera, se observó que las células que no mueren no son capaces de dividirse nuevamente, es decir, que se detiene la proliferación celular.

Al estudiar una de las proteínas más importantes en el proceso de autofagia, beclin-1, que participa en la inducción de autofagia, se encontró que en la línea CAL 27 se encuentra sobrepresada de manera ubicua, y su nivel de expresión no se ve afectado durante el tratamiento con EDLF. Esta alta expresión de beclin-1 podría indicar un alto grado de autofagia en esta línea celular como mecanismo de supervivencia. La línea CAL 33 no presenta unos altos niveles de expresión de esta proteína, pero a partir de las 6 h de tratamiento con EDLF se observó un aumento de expresión transitorio entre las 6 y 15 h y luego va desapareciendo. Esto podría sugerir que en la línea celular CAL 33 se induce la autofagia como mecanismo de resistencia a la apoptosis por EDLF. Por otra parte, se estudió otra de las proteínas importantes en la formación y maduración del autofagosoma, la LC3-I que se conjuga con fosfatidiletanolamina para formar a LC3-II que favorece la maduración del autofagolisosoma (Tanida et al, 2008). En la línea CAL 27 se observa la presencia de LC3-II de manera constitutiva y durante el tratamiento con EDLF presenta un leve aumento partir de las 15 h hasta las 48 h,

coincidiendo con la inducción de beclin-1. Estos cambios, aunque leves, podrían representar una respuesta de resistencia al tratamiento con EDLF. En cambio, en la línea CAL 33 se presenta la formación de LC3-II a partir de las 6 h de tratamiento hasta las 48 h, este dato coincide con el tiempo de inducción de beclin-1. De forma comparativa se pudo ver que el tiempo de inducción de la autofagia en la línea CAL 33 coincide con el tiempo de aparición de las vacuolas en la secuencia *time-lapse* (ver video Nº 4, Anexo Nº 1). Estos cambios en las células podrían sugerir que en la línea celular CAL 33 se esté induciendo la autofagia como mecanismo de resistencia a la muerte por apoptosis. El inhibidor de la autofagia cloroquina (aumenta el pH lisosomal, que lleva a la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma e impide la degradación protéica) (Shintani & Klionsky, 2004) induce en las dos líneas celulares de CCC un aumento en la apoptosis, sugiriendo que la autofagia actúa como un mecanismo de resistencia en estas líneas celulares. Sin embargo, la incubación conjunta de cloroquina y EDLF no afectó significativamente a la apoptosis inducida por EDLF, lo que sugeriría que las células de CCC no inducen autofagia como mecanismo de defensa frente a la apoptosis tras el tratamiento con EDLF. No obstante, no puede descartarse que se pueda incrementar la respuesta necrótica. De la misma manera se estudió el efecto que tiene sobre la apoptosis al emplear la wortmanina (inhibidor de PI3K, especialmente la PI3K clase III que participa en la activación de la autofagia) (Blommaert et al, 1997). De igual forma a lo observado con la cloroquina, se encontró que el tratamiento solo con este inhibidor favorece la apoptosis apoyando la hipótesis de que la autofagia constitutiva propia de las líneas celulares de CCC actúa como un mecanismo de supervivencia. Al tratar las células conjuntamente con wortmanina y EDLF se encontró un leve aumento en la apoptosis en células CAL 33. Estos datos en su conjunto sugieren que la autofagia en estas células de CCC podría actuar como un mecanismo de resistencia a la muerte celular, pero afecta solo ligeramente a la actividad proapoptótica inducida por EDLF, si bien en células CAL 33 este efecto es más acusado. El efecto de la autofagia en otros tipos de muerte inducidos por EDLF queda por determinar.

IX. INHIBICIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE AKT EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR EDLF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Como se ha descrito para otro tipo de tumores, la EDLF y algunos de sus análogos (perifosina) son conocidos por inhibir la ruta de PI3K/Akt, específicamente Akt, ya que impide su unión a la membrana para ser fosforilada, específicamente en los dominios de membrana “rafts” (Reis-Sobreiro et al, 2013). Al estudiar la inhibición de esta ruta en las líneas de CCC tratadas con EDLF, se observó en las dos líneas celulares una disminución en la fosforilación de Akt en el residuo Ser273. Si se compara con otro tipo de tumores, en los que la inhibición de la fosforilación se presenta a partir de las 3 h de tratamiento (Reis-Sobreiro et al, 2013), en el caso

de las líneas de CCC la fosforilación de Akt empieza a disminuir a partir de las 9 h de tratamiento. Es importante destacar que esta inhibición tardía pueda estar relacionada con la baja sensibilidad de estas líneas celulares a la respuesta apoptótica por EDLF. La sensibilidad a la apoptosis de estos ATLS se ha visto en varios tumores que depende en gran medida del grado de fosforilación de Akt (Elrod et al, 2007; Reis-Sobreiro et al, 2013). En este caso se encontró que las dos líneas celulares de CCC presentan una fosforilación basal importante de Akt. Al usar inhibidores específicos de esta quinasa, se encontró que el uso del inhibidor de Akt por si solo aumenta el porcentaje de apoptosis entre el 20 al 30%, por lo que es probable que Akt sea una de los principales mecanismos responsables de la resistencia a la apoptosis en este tipo de tumor. Al comparar el porcentaje de apoptosis entre el tratamiento solo con el inhibidor de Akt III y la EDLF, esta última presenta un porcentaje de apoptosis mayor, lo que puede indicar que el efecto sobre la inhibición de Akt por parte de la EDLF es más potente que el propio inhibidor de Akt III. Estructuralmente, el inhibidor III de Akt y la EDLF son similares, se diferencian únicamente en que el grupo colina de la EDLF es reemplazado por inositol (Reis-Sobreiro et al, 2013), por lo que posiblemente estén inhibiendo de la misma forma a esta quinasa, actuando como sustratos competitivos del fosfatidil-inositol, impidiendo la activación de Akt sin disminuir la fosforilación de PDK-1. Al usar de manera conjunta la EDLF y el inhibidor de Akt III, hay un aumento en el porcentaje de apoptosis significativo en la línea celular CAL 27, pero no en las células CAL 33, lo que puede indicar que en la línea celular CAL 27, Akt sea más importante en el proceso tumoral que en la línea CAL 33. Al emplear el inhibidor de Akt X, hay menor actividad proapoptótica que el inhibidor III y la EDLF en estas líneas celulares. Al tratar las células conjuntamente con el inhibidor de Akt X y la EDLF se observa una disminución significativa en el porcentaje de apoptosis. Este resultado es repetitivo, pero en la actualidad es difícil explicar dicho comportamiento entre dos inhibidores de Akt, aunque se podría especular en que la participación de distintos mecanismos de acción por parte de los inhibidores de Akt y de EDLF podría dar lugar a efectos distintos e incluso contrarios.

X. IAPS EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR EDLF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El papel que cumplen las proteínas IAPs (*inhibitors of apoptosis*) en el proceso de control de la apoptosis es importante ya que inhiben la activación de caspasas (LaCasse et al, 2009). A su vez, se ha descrito que la inhibición de estas proteínas puede favorecer la autofagia como mecanismo de muerte en varias líneas celulares (Abe & Kokuba, 2013; Chiu et al, 2011). Al estudiar dos proteínas de esta familia (XIAP y survivin) en CCC, se encontró que a tiempos largos hay una disminución en los niveles de estas proteínas por efecto de EDLF, esto podría favorecer

la inducción de apoptosis o sugerir que dentro del proceso de muerte inducido por EDLF pueda estar participando la autofagia, lo que podría ofrecer una cierta resistencia a la muerte celular.

XI. MODELO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE EDLF EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

La **Figura Nº 45** describe un modelo hipotético del mecanismo de acción de EDLF en células de CCC basado en los resultados obtenidos en este trabajo. De forma general se puede deducir que el mecanismo de acción de la EDLF en CCC se presenta de la siguiente manera: inicialmente se produce la incorporación de la EDLF a la célula que provoca su acumulación en el RE; esta acumulación provoca estrés en este orgánulo; se induce la generación de ROS, y la liberación de calcio al citosol; se induce la fosforilación de JNK, activación de la ruta intrínseca mitocondrial de apoptosis y la inducción de muerte celular por apoptosis. Es posible que la activación de JNK, así como otros procesos bioquímicos, puedan activar diferentes rutas de señalización dependiendo de la célula, incluyendo rutas que activan la necrosis como mecanismo de muerte, ya que a partir de las 3 h de tratamiento las células son capaces de incorporar yoduro de propidio y sufren la hiperpolarización de la membrana mitocondrial. Los resultados aquí descritos indican que tras el tratamiento con EDLF en células de CCC se pueden inducir apoptosis, necrosis y autofagia, dependiendo del tipo celular, actuando las dos primeras respuestas como procesos de muerte y la autofagia como resistencia a la muerte celular. Existe una fuerte interrelación entre estos tres procesos y la inhibición específica de un tipo de muerte favorece la inducción del otro mecanismo de muerte celular. En este sentido, una inhibición de necroptosis favorece la apoptosis y viceversa.

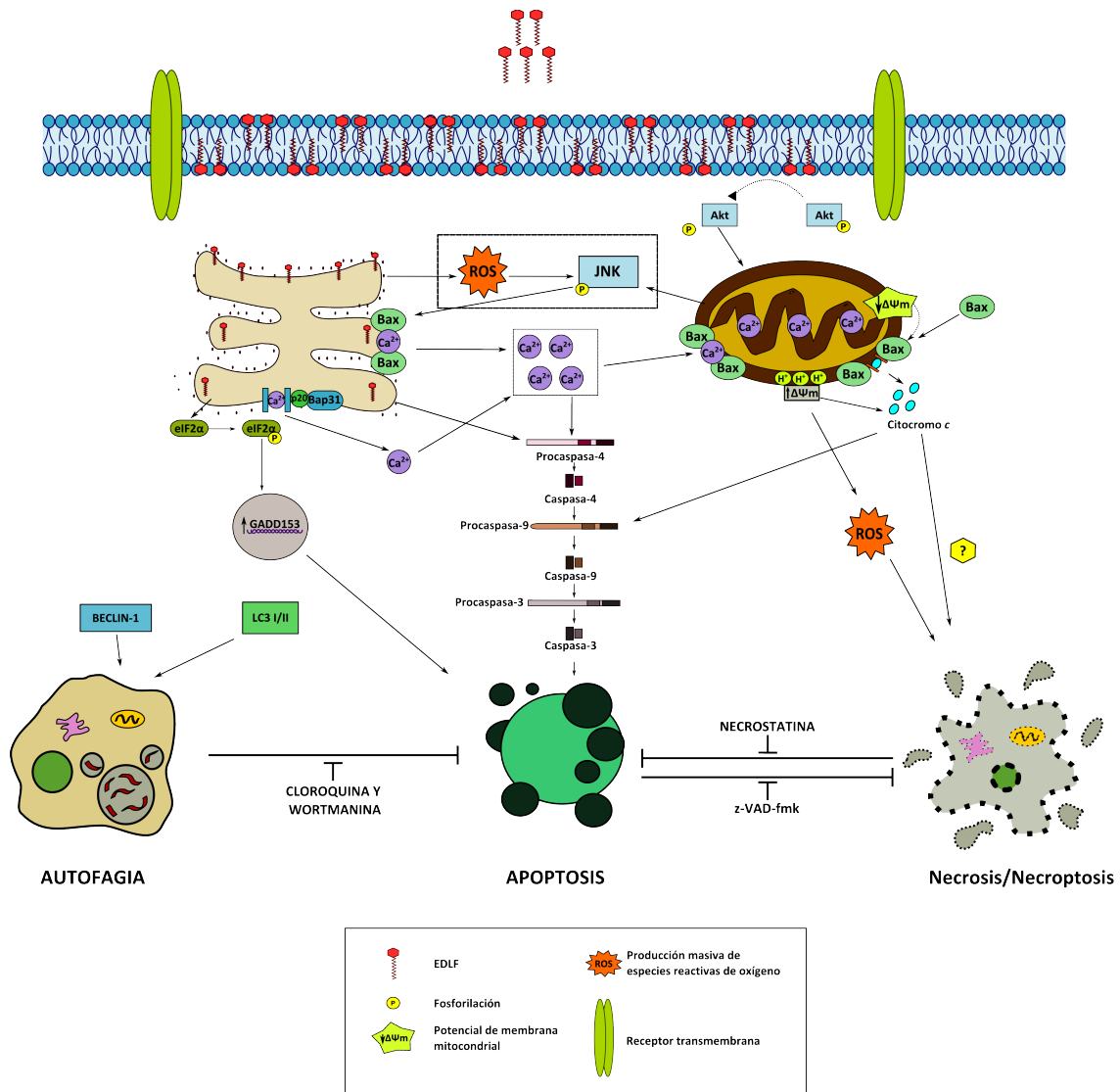


Figura Nº 45: Esquema de un posible modelo para el mecanismo de acción de EDLF sobre células de CCC: Se describe un posible modelo del mecanismo de acción de la EDLF en la inducción de muerte celular en células de CCC. Tras su incorporación en la célula, EDLF se acumula en el retículo endoplasmático, induciendo un estrés de retículo y una señalización apoptótica que implica procesos generados a través del retículo endoplasmático y la mitocondria, y que conllevan a la activación de procesos de muerte celular por apoptosis y necroptosis/necrosis. Procesos autofágicos presentes en la célula de CCC actuarían como procesos de resistencia a la muerte celular. Para mayor información, véase el texto.

CONCLUSIONES

SARCOMA DE EWING

- La edelfosina es el compuesto con mayor actividad apoptótica de los ATLs probados en las células de sarcoma de Ewing, induciendo apoptosis a concentraciones similares a las que se encuentran en plasma en estudio con modelos animales.
- Edelfosina induce apoptosis en células tumorales de sarcoma de Ewing a través de su acumulación en el retículo endoplasmático y la subsiguiente generación de un estrés en el mismo, con una importante participación de la activación de caspasa-4 y la señalización mediada por JNK. El tratamiento con edelfosina promueve la formación del fragmento p20 a partir de Bap31, sugiriéndose una transmisión de la señalización apoptótica desde el retículo endoplasmático a la mitocondria.
- La mitocondria participa activamente en el proceso de muerte generado por EDLF en las líneas celulares de SE, a través de su papel en la liberación de citocromo c y posterior activación de la caspasa-9 así como foco generador de especies reactivas de oxígeno causando estrés oxidativo en la célula.
- La incorporación de EDLF en las células de SE es fundamental para su actividad proapoptótica, esta mediada por el contenido en colesterol de la membrana, y conlleva a la reorganización de la composición proteica de los dominios de membrana *lipid rafts*.
- La edelfosina, por administración oral, presenta actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de xenotransplante de sarcoma de Ewing, siendo capaz de llegar y acumularse en el tejido tumoral, donde ejerce su acción proapoptótica a través de la activación de la respuesta por el retículo endoplasmático.

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

- La edelfosina resultó ser el ATL con mayor actividad citotóxica en cáncer de cabeza y cuello, siendo su acción dependiente de su incorporación en la célula tumoral, la cual a su vez depende del contenido de colesterol en la membrana.
- La edelfosina se acumula en el retículo endoplasmático de las células de cáncer de cabeza y cuello, induciendo estrés de retículo endoplásmico y posteriormente la muerte celular por apoptosis dependiente de caspasas.
- La respuesta apoptótica inducida por edelfosina en células de cáncer de cabeza y cuello implica la participación de la señalización intrínseca mitocondrial, generación de sustancias reactivas de oxígeno y la activación persistente de JNK.
- Edelfosina induce distintos tipos de muerte alternativos que se afectan entre sí, en particular necrosis/necroptosis y apoptosis, en células de CCC que parecen activarse de forma paralela y se ponen más claramente de manifiesto tras la inhibición de uno de los tipos de muerte alternativa.
- Procesos de autofagia, la ruta de señalización PI3K/Akt y proteínas IAPs parecen jugar un papel en la regulación de apoptosis en células de CCC tras el tratamiento con EDLF.

BIBLIOGRAFÍA

Abe A, Kokuba H (2013) Harmol induces autophagy and subsequent apoptosis in U251MG human glioma cells through the downregulation of survivin. *Oncol Rep* **29**: 1333-1342

Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337

Agostinis P, Afshin S, Lhomond Sp, Chevet E (2012) Signaling the Unfolded Protein Response in cancer. In *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*, pp 357-382. Springer Netherlands

Ahmad I, Filep JJ, Franklin JC, Janoff AS, Masters GR, Pattassery J, Peters A, Schupsky JJ, Zha Y, Mayhew E (1997) Enhanced therapeutic effects of liposome-associated 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Cancer Res* **57**: 1915-1921

Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP (1997) Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* **79**: 380-389

Álava E (2007) Molecular pathology in sarcomas. *Clinical and Translational Oncology* **9**: 130-144

Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS (2005) Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* **65**: 9953-9961

Andreesen R, Modolell M, Munder PG (1979) Selective sensitivity of chronic myelogenous leukemia cell populations to alkyl-lysophospholipids. *Blood* **54**: 519-523

Arcaro A, Aubert M, Espinosa del Hierro ME, Khanzada UK, Angelidou S, Tetley TD, Bittermann AG, Frame MC, Seckl MJ (2007) Critical role for lipid raft-associated Src kinases in activation of PI3K-Akt signalling. *Cell Signal* **19**: 1081-1092

Argiris A, Cohen E, Karrison T, Esparaz B, Mauer A, Ansari R, Wong S, Lu Y, Pins M, Dancey J, Vokes E (2006) A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* **5**: 766-770

Balamuth NJ, Womer RB (2010) Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* **11**: 184-192

Beltran PJ, Chung YA, Moody G, Mitchell P, Cajulis E, Vonderfecht S, Kendall R, Radinsky R, Calzone FJ (2011) Efficacy of ganitumab (AMG 479), alone and in combination with rapamycin, in Ewing's and osteogenic sarcoma models. *J Pharmacol Exp Ther* **337**: 644-654

Beneteau M, Pizon M, Chaigne-Delalande B, Daburon S, Moreau P, De Giorgi F, Ichas F, Rebillard A, Dimanche-Boitrel MT, Taupin JL, Moreau JF, Legembre P (2008) Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res* **6**: 604-613

Benini S, Manara MC, Baldini N, Cerisano V, Massimo S, Mercuri M, Lollini PL, Nanni P, Picci P, Scotlandi K (2001) Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor

activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res* **7**: 1790-1797

Benini S, Manara MC, Cerisano V, Perdichizzi S, Strammiello R, Serra M, Picci P, Scotlandi K (2004) Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *Int J Cancer* **108**: 358-366

Benini S, Zuntini M, Manara MC, Cohen P, Nicoletti G, Nanni P, Oh Y, Picci P, Scotlandi K (2006) Insulin-like growth factor binding protein 3 as an anticancer molecule in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* **119**: 1039-1046

Berdel WE, Bausert WR, Weltzien HU, Modolell ML, Widmann KH, Munder PG (1980) The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid-activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma. *Eur J Cancer* **16**: 1199-1204

Berghe TV, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P (2009) Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* **17**: 922-930

Bernier J, Rodriguez C, Adelstein D (2011) Principles of Systemic Chemotherapy for Squamous Cell Head and Neck Cancer. In *Head and Neck Cancer*, pp 281-291. Springer New York

Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H (2006) Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* **11**: 503-519

Best SR, Niparko KJ, Pai SI (2012) Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol Clin North Am* **45**: 807-822

Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **243**: 240-246

Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T (1998) The Kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Current Biology* **8**: 779-785

Bogoyevitch MA, Ngoei KRW, Zhao TT, Yeap YYC, Ng DCH (2010) c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**: 463-475

Boutros T, Chevet E, Metrakos P (2008) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/MAP Kinase Phosphatase Regulation: Roles in Cell Growth, Death, and Cancer. *Pharmacological Reviews* **60**: 261-310

Bovee JV, Hogendoorn PC (2009) Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch* **456**: 193-199

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003a) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**: 8608-8618

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC (2003b) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *The Journal of Cell Biology* **160**: 1115-1127

Brumbaugh J, Ferris R, Hu S (2011) HPV and EBV in Head and Neck Cancer. In *Head and Neck Cancer*, Bernier J (ed), 7, pp 121-134. Springer New York

Bui M, Zhang P (2010) Ewing Sarcoma: Molecular Characterization and Potential Molecular Therapeutic Targets. In *Mechanisms of Oncogenesis*, Coppola D (ed), Vol. 12, 10, pp 159-166. Springer Netherlands

Bukowski R, Figlin R, Motzer R, Cho D, Mier J, Atkins M (2009) PI3K/Akt/mTOR Pathway: A Growth and Proliferation Pathway. In *Renal Cell Carcinoma*, pp 267-285. Humana Press

Bunney TD, Katan M (2010) Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat Rev Cancer* **10**: 342-352

Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD (2012) The epidemiology of sarcoma. *Clinical sarcoma research* **2**: 14

Cabon L, Galan-Malo P, Bouharrou A, Delavallee L, Brunelle-Navas MN, Lorenzo HK, Gross A, Susin SA (2011) BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ* **19**: 245-256

Cagnol S, Chambard JC (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* **277**: 2-21

Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC (2006) Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* **11**: 337-346

Calay D, Vind-Kezunovic D, Frankart A, Lambert S, Poumay Y, Gniadecki R (2010) Inhibition of Akt signaling by exclusion from lipid rafts in normal and transformed epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **130**: 1136-1145

Campello S, Scorrano L (2009) The Mitochondrial Pathway: Focus on Shape Changes. In *Essentials of Apoptosis*, Dong Z, Yin X-M (eds), 6, pp 151-175. Humana Press

Campo ML (2009) Apoptosis. In *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasi*, Salido G, Rosado J (eds), 2, pp 17-55. Springer Netherlands

Cao J, Liu Y, Jia L, Zhou H-M, Kong Y, Yang G, Jiang L-P, Li Q-J, Zhong L-F (2007) Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **43**: 968-975

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* **8**: 187-198

Carson DA, Ribeiro JM (1993) Apoptosis and disease. *The Lancet* **341**: 1251-1254

Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S, Bernard G, Manara MC, Benini S, Cenacchi G, Preda P, Lattanzi G, Nagy B, Knuutila S, Colombo MP, Bernard A, Picci P, Scotlandi K (2004) Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene* **23**: 5664-5674

Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**: 749-762

Cironi L, Riggi N, Provero P, Wolf N, Suva ML, Suva D, Kindler V, Stamenkovic I (2008) IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PLoS One* **3**: e2634

Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**: 647-656

Croft SL, Snowdon D, Yardley V (1996) The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* **38**: 1041-1047

Curado MP, Hashibe M (2009) Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* **21**: 194-200

Chambers JW, LoGrasso PV (2011) Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* **286**: 16052-16062

Chandhanayingyong C, Kim Y, Staples JR, Hahn C, Lee FY (2012) MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. *Sarcoma* **2012**: 404810

Chiarini F, Del Sole M, Mongiorgi S, Gaboardi GC, Cappellini A, Mantovani I, Follo MY, McCubrey JA, Martelli AM (2008) The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia* **22**: 1106-1116

Chiu HW, Ho YS, Wang YJ (2011) Arsenic trioxide induces autophagy and apoptosis in human glioma cells in vitro and in vivo through downregulation of survivin. *J Mol Med (Berl)* **89**: 927-941

Choi K, Kim J, Kim GW, Choi C (2009) Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res* **6**: 213-222

Choi S, Hao J, Daleo M, Hong C (2010) Crosstalk Between Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphoinositide-3 Kinase Signaling Pathways in Development and Disease. In *Systems Biology for Signaling Networks* Vol. 1, pp 505-529. Springer New York

Chung CH, Gillison ML (2009) Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* **15**: 6758-6762

- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**: 1944-1956
- Dakubo G (2010) Mitochondrial Control of Apoptosis and Cancer. In *Mitochondrial Genetics and Cancer*, pp 67-92. Springer Berlin Heidelberg
- Dalal S, Berry AM, Cullinane CJ, Mangham DC, Grimer R, Lewis IJ, Johnston C, Laurence V, Burchill SA (2005) Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. *Clin Cancer Res* **11**: 2364-2378
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell* **116**: 205-219
- Das U (2011) Cell Membrane Organization. In *Molecular Basis of Health and Disease*, pp 153-173. Springer Netherlands
- Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, Delattre O (2001) Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* **20**: 3258-3265
- Davies AM, Sundaram M, James SLJ, Vanhoenacker FM, Kerkhove F, Peersman B, Brys P, Schepper AM (2009) Ewing Sarcoma/PNET Tumors. In *Imaging of Bone Tumors and Tumor-Like Lesions*, pp 337-349. Springer Berlin Heidelberg
- de Laurentiis A, Donovan L, Arcaro A (2007) Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J* **1**: 12-32
- Delavallee L, Cabon L, Galan-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA (2011) AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* **63**: 221-232
- Deshpande AM, Wong DT (2008) Molecular mechanisms of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**: 799-809
- Dewaele M, Maes H, Agostinis P (2010) ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy* **6**: 838-854
- Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**: 6245-6251
- Dineva I, Zaharieva M, Konstantinov S, Eibl Hr, Berger M Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **138**: 1909-1917
- Ding W-X, Yin X-M (2009) The Bcl-2 Family Proteins. In *Essentials of Apoptosis*, Dong Z, Yin X-M (eds), 2, pp 25-61. Humana Press
- Dobrossy L (2005) Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 9-17
- Dong Z, Yin X-M, Shen H-M, Pervaiz S (2009) Reactive Oxygen Species in Cell Fate Decisions. In *Essentials of Apoptosis*, pp 199-221. Humana Press

Ehrhardt H, Hacker S, Wittmann S, Maurer M, Borkhardt A, Toloczko A, Debatin KM, Fulda S, Jeremias I (2008) Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells. *Oncogene* **27**: 783-793

El-Naggar A (2011) Cellular and Molecular Pathology of Head and Neck Tumors. In *Head and Neck Cancer*, Bernier J (ed), 3, pp 57-79. Springer New York

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495-516

Elrod HA, Lin YD, Yue P, Wang X, Lonial S, Khuri FR, Sun SY (2007) The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther* **6**: 2029-2038

Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* **9**: 550-562

Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* **7**: 606-619

Erkizan HV, Uversky VN, Toretsky JA (2010) Oncogenic partnerships: EWS-FLI1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* **16**: 4077-4083

Ernst DS, Eisenhauer E, Wainman N, Davis M, Lohmann R, Baetz T, Belanger K, Smylie M (2005) Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs* **23**: 569-575

Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB, Jr. (2008) Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* **30**: 425-430

Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ (2009) Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. *Clin Cancer Res* **15**: 858-864

Eyre R, Feltbower RG, Mubwandarikwa E, Eden TOB, McNally RJQ (2009) Epidemiology of bone tumours in children and young adults. *Pediatric Blood & Cancer* **53**: 941-952

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 391-400

Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo C, Suela J, Teixeira MR, Cerveira N, Molares A, Gomez-Lopez G, Pestana A, Sastre A, Garcia-Miguel P, Cigudosa JC (2007) Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene* **27**: 2084-2090

Fichtner I, Zeisig R, Naundorf H, Jungmann S, Arndt D, Asongwe G, Double JA, Bibby MC (1994) Antineoplastic activity of alkylphosphocholines (APC) in human breast carcinomas in vivo and in vitro; use of liposomes. *Breast Cancer Res Treat* **32**: 269-279

Filadi R, Zampese E, Pozzan T, Pizzo P, Fasolato C (2012) Endoplasmic Reticulum-mitochondria connections, calcium cross-talk and cell fate: a closer inspection. In *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*, Agostinis P, Afshin S (eds), 4, pp 75-106. Springer Netherlands

Fischer U, Schulze-Osthoff K (2005) Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**: 942-961

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) PI3K//Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**: 8983-8998

Freudlsperger C, Burnett JR, Friedman JA, Kannabiran VR, Chen Z, Van Waes C (2010) EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin Ther Targets* **15**: 63-74

Fu Y, Li J, Lee AS (2007) GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* **67**: 3734-3740

Fulda S (2009) Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* **124**: 511-515

Fulda S, Debatin KM (2002) IFN γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* **21**: 2295-2308

Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811

Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* **20**: 5865-5877

Fung C, Grandis JR Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. *Expert Opin Emerg Drugs* **15**: 355-373

Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, Veldman RJ, Mollinedo F (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* **200**: 353-365

Gajate C, Fonteriz RI, Cabaner C, Alvarez-Noves G, Alvarez-Rodriguez Y, Modolell M, Mollinedo F (2000a) Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* **85**: 674-682

Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F (2009) Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS One* **4**: e5044

Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir el H, Fonteriz RI, Alvarez J, Mollinedo F (2011) Antitumor alkyllysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* **31**: 2627-2639

- Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir el H, Fonteriz RI, Alvarez J, Mollinedo F (2012) Antitumor alkyllysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* **31**: 2627-2639
- Gajate C, Mollinedo F (2001) The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* **98**: 3860-3863
- Gajate C, Mollinedo F (2002) Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab* **3**: 491-525
- Gajate C, Mollinedo F (2007) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **109**: 711-719
- Gajate C, Mollinedo F (2011) Lipid rafts and Fas/CD95 signaling in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **6**: 274-283
- Gajate C, Santos-Beneit A, Modolell M, Mollinedo F (1998) Involvement of c-Jun NH2-terminal kinase activation and c-Jun in the induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Mol Pharmacol* **53**: 602-612
- Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, Lazaro M, Hernandez-De Rojas A, Modolell M, Munoz E, Mollinedo F (2000b) Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* **86**: 208-218
- Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G (2006) Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4812-4830
- Garcia-Santos G, Martin V, Rodriguez-Blanco J, Herrera F, Casado-Zapico S, Sanchez-Sanchez AM, Antolin I, Rodriguez C (2012) Fas/Fas ligand regulation mediates cell death in human Ewing's sarcoma cells treated with melatonin. *Br J Cancer* **106**: 1288-1296
- Garofalo C, Mancarella C, Grilli A, Manara MC, Astolfi A, Marino MT, Conte A, Sigismund S, Care A, Belfiore A, Picci P, Scotlandi K (2012) Identification of common and distinctive mechanisms of resistance to different anti-IGF-IR agents in Ewing's sarcoma. *Mol Endocrinol* **26**: 1603-1616
- George KS, Wu S (2012) Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicology and Applied Pharmacology* **259**: 311-319
- Ghibelli L, Diederich M (2010) Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* **10**: 604-613
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R (2008) Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **100**: 407-420

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* **92**: 709-720

Gills J, Dennis P (2009) Perifosine: Update on a novel Akt inhibitor. *Current Oncology Reports* **11**: 102-110

Gold KA, Lee HY, Kim ES (2009) Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **115**: 922-935

Guicciardi M, Gores G (2009) The Death Receptor Pathway. In *Essentials of Apoptosis*, Dong Z, Yin X-M (eds), 5, pp 119-150. Humana Press

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70

Harr M, Distelhorst C (2009) The Endoplasmic Reticulum Pathway. In *Essentials of Apoptosis*, Dong Z, Yin X-M (eds), 7, pp 177-197. Humana Press

Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A (2009) Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* **625**: 234-246

Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 733-744

Heesbeen EC, Verdonck LF, Hermans SW, van Heugten HG, Staal GE, Rijksen G (1991) Alkyllysophospholipid ET-18-OCH₃ acts as an activator of protein kinase C in HL-60 cells. *FEBS Lett* **290**: 231-234

Helms JB, Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **5**: 247-254

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 988-1004

Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* **23**: 2850-2860

Hernandez C. (2007) Cáncer de Cabeza y Cuello. In Ediciones A (ed.), *Mini Materiales Prácticos*. Arán Ediciones.

Herrero-Martin D, Osuna D, Ordonez JL, Sevillano V, Martins AS, Mackintosh C, Campos M, Madoz-Gurpide J, Otero-Motta AP, Caballero G, Amaral AT, Wai DH, Braun Y, Eisenacher M, Schaefer KL, Poremba C, de Alava E (2009) Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. *Br J Cancer* **101**: 80-90

Herrmann DB, Pahlke W, Opitz HG, Bicker U (1990) In vivo antitumor activity of ilmofosine. *Cancer Treat Rev* **17**: 247-252

Herzog CE (2005) Overview of sarcomas in the adolescent and young adult population. *J Pediatr Hematol Oncol* **27**: 215-218

- Ho PS, Ko YC, Yang YH, Shieh TY, Tsai CC (2002) The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: an endemic betel quid chewing area. *J Oral Pathol Med* **31**: 213-219
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **13**: 714-726
- Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR (2005) Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **41**: 156-160
- Hotfilder M, Sondermann P, Senss A, van Valen F, Jurgens H, Vormoor J (2005) PI3K/AKT is involved in mediating survival signals that rescue Ewing tumour cells from fibroblast growth factor 2-induced cell death. *Br J Cancer* **92**: 705-710
- Howard JD, Lu B, Chung CH (2011) Therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma: identification, evaluation, and clinical translation. *Oral Oncol* **48**: 10-17
- Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ (2005) EWS-FLI1 Fusion Protein Up-regulates Critical Genes in Neural Crest Development and Is Responsible for the Observed Phenotype of Ewing's Family of Tumors. *Cancer Research* **65**: 4633-4644
- Huang P, Han J, Hui L (2010) MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein & Cell* **1**: 218-226
- Hughes DP (2009) Novel agents in development for pediatric sarcomas. *Curr Opin Oncol* **21**: 332-337
- IARC W. (2008) <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>. In IARC-WHO (ed.), *GLOBOCAN FAST DATABASE*.
- Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**: 277-288
- Irina S. Babina SD, Ivan R. Nabi and Ann M. Hopkins . , Available from: <http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-carcinogenesis-cell-growth-and-signalling-pathways/lipid-rafts-as-master-regulators-of-breast-cancer-cell-function> ((2011)) Lipid Rafts as Master Regulators of Breast Cancer Cell Function, Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways. *Prof Mehmet Gunduz (Ed)*
- Iwamoto Y (2007) Diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma. *Jpn J Clin Oncol* **37**: 79-89
- Iwasawa R, Mahul-Mellier A-L, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S (2010) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J* **30**: 556-568
- Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Los M (2013) Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* **17**: 12-29

- Jedlicka P (2010) Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* **3**: 338-347
- Johnson N, Amarasinghe H (2011) Epidemiology and Aetiology of Head and Neck Cancers. In *Head and Neck Cancer*, Bernier J (ed), 1, pp 1-40. Springer New York
- Jurgens H, Dirksen U (2011) Ewing sarcoma treatment. *Eur J Cancer* **47 Suppl 3**: S366-367
- Kaatsch P (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treatment Reviews* **36**: 277-285
- Kaiser H, Nasir A, Kopper Ls, PetÄjk In (2008) Apoptosis and cancer. In *Selected Aspects of Cancer Progression: Metastasis, Apoptosis and Immune Response* Vol. 11, pp 103-113. Springer Netherlands
- Kalthoff H, SchÄtze S, Schneider-Brachert W (2009) Impact of TNF-R1 and CD95 Internalization on Apoptotic and Antiapoptotic Signaling. In *Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer* Vol. 49, pp 63-85. Springer Berlin Heidelberg
- Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* **24**: 2666-2672
- Kanno S, Tomizawa A, Ohtake T, Koiwai K, Ujibe M, Ishikawa M (2006) Naringenin-induced apoptosis via activation of NF-kappaB and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol Lett* **166**: 131-139
- Karosas AO (2010) Ewing's sarcoma. *Am J Health Syst Pharm* **67**: 1599-1605
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology* **17**: 615-675
- Kelleher FC, Thomas DM (2012) Molecular pathogenesis and targeted therapeutics in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumours. *Clin Sarcoma Res* **2**: 6
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257
- Kim EK, Choi E-J (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1802**: 396-405
- Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, Cheng SL (2003) Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* **278**: 21920-21929
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S (2006) Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* **11**: 5-13
- Klee M, Pimentel-Muinos FX (2005) Bcl-X(L) specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **168**: 723-734

Klein CA, Stoecklein NH (2009) Lessons from an Aggressive Cancer: Evolutionary Dynamics in Esophageal Carcinoma. *Cancer Research* **69**: 5285-5288

Klein JD, Grandis JR (2010) The molecular pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* **9**: 1-7

Klussmann E, Scott J, Brown MD, Sacks DB (2008) Compartmentalised MAPK Pathways. In *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets* Vol. 186, pp 205-235. Springer Berlin Heidelberg

Knowling M, Blackstein M, Tozer R, Bramwell V, Dancey J, Dore N, Matthews S, Eisenhauer E (2006) A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest New Drugs* **24**: 435-439

Kolb EA, Gorlick R (2009) Development of IGF-IR inhibitors in pediatric sarcomas. *Current Oncology Reports* **11**: 307-313

Kontny HU, Hammerle K, Klein R, Shayan P, Mackall CL, Niemeyer CM (2001) Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **8**: 506-514

Kontny HU, Lehrnbecher TM, Chanock SJ, Mackall CL (1998) Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* **58**: 5842-5849

Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G, Gadner H (1996) EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* **7**: 429-437

Kreuter M, Paulussen M, Boeckeler J, Gerss J, Buerger H, Liebscher C, Kessler T, Jurgens H, Berdel WE, Mesters RM (2006) Clinical significance of Vascular Endothelial Growth Factor-A expression in Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* **42**: 1904-1911

Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C (1992) Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1630-1634

LaCasse E, Cheung H, Hunter A, Plenchette S, Mahoney D, Korneluk R (2009) The Mammalian IAPs: Multifaceted Inhibitors of Apoptosis. In *Essentials of Apoptosis*, Dong Z, Yin X-M (eds), 3, pp 63-93. Humana Press

Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, Couvreur P (2000) EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 401-406

Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, Rossi I, Ricci C, Astolfi A, Scopece L, Scotlandi K, Serra M, Bagnara GP, Nanni P, Lollini PL (2000) The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am J Pathol* **157**: 2123-2131

Lango MN (2009) Tratamiento multimodal del cáncer de cabeza y cuello. *Surg Clin N Am* **89** 43-52

Lee KW, Kuo WR, Tsai SM, Wu DC, Wang WM, Fang FM, Chiang FY, Ho KY, Wang LF, Tai CF, Kao EL, Chou SH, Lee CH, Chai CY, Ko YC (2005) Different impact from betel quid, alcohol and cigarette: risk factors for pharyngeal and laryngeal cancer. *Int J Cancer* **117**: 831-836

Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* **11**: 9-22

Leonard R, Hardy J, van Tienhoven G, Houston S, Simmonds P, David M, Mansi J (2001) Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *J Clin Oncol* **19**: 4150-4159

Li J, Lee AS (2006) Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* **6**: 45-54

Li Z-y, Yang Y, Ming M, Liu B (2011) Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **414**: 5-8

Liao YM, Kim C, Yen Y (2011) Mammalian target of rapamycin and head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* **3**: 22

Ling LU, Tan KB, Lin H, Chiu GN (2011) The role of reactive oxygen species and autophagy in safingol-induced cell death. *Cell Death Dis* **2**: e129

Lissat A, Chao MM, Kontny U (2012) Targeted therapy in Ewing sarcoma. *ISRN Oncol* **2012**: 609439

Lissat A, Vraetz T, Tsokos M, Klein R, Braun M, Koutelia N, Fisch P, Romero ME, Long L, Noellke P, Mackall CL, Niemeyer CM, Kontny U (2007) Interferon-gamma sensitizes resistant Ewing's sarcoma cells to tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of caspase-8 without altering chemosensitivity. *Am J Pathol* **170**: 1917-1930

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 627-644

Lopez-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, Grandis JR, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL (2009) Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent in vitro cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother* **58**: 1853-1864

Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang ZF, Winn D, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Shangina O, Schwartz SM, Rudnai P, Neto JE, Muscat J, Morgenstern H, Menezes A, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Herrero R, Franceschi S, Wunsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Maso LD, Curado MP, Chen C, Castellsague X, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M, Hayes RB (2009) Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* **170**: 937-947

Ludwig JA (2008) Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol* **20**: 412-418

Luo B, Lee AS (2012) The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* **32**: 805-818

Mackintosh C, Madoz-Gurpide J, Ordonez JL, Osuna D, Herrero-Martin D (2010) The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol Ther* **9**: 655-667

Magistrelli A, Villa P, Benfenati E, Modest EJ, Salmona M, Tacconi MT (1995) Fate of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18-OME) in malignant cells, normal cells, and isolated and perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* **23**: 113-118

Maheshwari AV, Cheng EY (2010) Ewing sarcoma family of tumors. *J Am Acad Orthop Surg* **18**: 94-107

Maksimenko A, Malvy C (2005) Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma. *Expert Opin Ther Targets* **9**: 825-830

Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* **9**: 2277-2293

Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274

Markovic A, Chung CH (2012) Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **12**: 1149-1159

Martin P, Poggi MC, Chambard JC, Boulukos KE, Pognonec P (2006) Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* **350**: 803-807

Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F (2009) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol* **158**: 1-9

Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, Campos M, Hernandez T, Ordonez JL, de Alava E (2006) Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* **12**: 3532-3540

Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Tirado OM, Notario V (2006) Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* **12**: 6781-6790

Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V (2003) Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* **22**: 9282-9287

Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* **2**: 318-325

McAllister NR, Lessnick SL (2005) The potential for molecular therapeutic targets in Ewing's sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* **6**: 461-471

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**: 1249-1259

McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**

Médica SEdO. (2013) Sarcomas óseos - Diagnostico, pronóstico y tratamiento del sarcoma de Ewing - See more at: <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/sarcomas/oseosewing?start=8#sthash.pjTsTK3g.dpuf>.

Mehan S, Meena H, Sharma D, Sankhla R (2011) JNK: A Stress-Activated Protein Kinase Therapeutic Strategies and Involvement in Alzheimer's and Various Neurodegenerative Abnormalities. *Journal of Molecular Neuroscience* **43**: 376-390

Meuillet EJ (2011) Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain. *Curr Med Chem* **18**: 2727-2742

Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M (2001) Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res* **61**: 2704-2712

Miyagawa Y, Okita H, Nakaijima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N (2008) Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* **28**: 2125-2137

Modolell M, Andreesen R, Pahlke W, Brugger U, Munder PG (1979) Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyl-lysophospholipids. *Cancer Res* **39**: 4681-4686

Mollinedo F (2009) Death Receptors in Multiple Myeloma and Therapeutic Opportunities. In *Myeloma Therapy*, Lonial S (ed), 25, pp 393-419. Humana Press

Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ (2010a) Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* **29**: 3748-3757

Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, de Frias M, Roue G, Gil J, Colomer D, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ (2010b) In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res* **16**: 2046-2054

Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, Modolell M (1997) Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res* **57**: 1320-1328

Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, Acuna AU, Nieto-Miguel T, Villa-Pulgarin JA, Gonzalez-Garcia C, Cena V, Gajate C (2011) Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis* **2**: e158

Mollinedo F, Gajate C (2006) Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: New targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resistance Updates* **9**: 51-73

Mollinedo F, Gajate C, Martin-Santamaria S, Gago F (2004) ET-18-OCH₃ (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem* **11**: 3163-3184

Mor A, Philips MR (2006) COMPARTMENTALIZED RAS/MAPK SIGNALING. *Annual Review of Immunology* **24**: 771-800

Mora J, Rodriguez E, de Torres C, Cardesa T, Rios J, Hernandez T, Cardesa A, de Alava E (2011) Activated growth signaling pathway expression in Ewing sarcoma and clinical outcome. *Pediatr Blood Cancer* **58**: 532-538

Morgan MJ, Kim YS, Liu Z (2007) Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal* **9**: 1471-1483

Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG (2008) TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res* **18**: 343-349

Naing A, LoRusso P, Fu S, Hong DS, Anderson P, Benjamin RS, Ludwig J, Chen HX, Doyle LA, Kurzrock R (2012) Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors. *Clin Cancer Res* **18**: 2625-2631

Nakashima T, Kuratomi Y, Yasumatsu R, Masuda M, Koike K, Umezaki T, Clayman GL, Nakagawa T, Komune S (2005) The effect of cyclin D1 overexpression in human head and neck cancer cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **262**: 379-383

Ni M, Zhang Y, Lee AS (2011) Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochemical Journal* **434**: 181-188

Nicolson GL (2013) The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*

Nieto-Miguel T, Fonteriz RI, Vay L, Gajate C, Lopez-Hernandez S, Mollinedo F (2007) Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. *Cancer Res* **67**: 10368-10378

Nieto-Miguel T, Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F (2008) Proapoptotic role of Hsp90 by its interaction with c-Jun N-terminal kinase in lipid rafts in edelfosine-mediated antileukemic therapy. *Oncogene* **27**: 1779-1787

Nieto-Miguel T, Gajate C, Mollinedo F (2006) Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells. *J Biol Chem* **281**: 14833-14840

NIH NHI. (2013) Cancer de Cabeza y Cuello. *Páginas Informativas*. NIH- National Health Institute of United States of America, Vol. 2013.

Olmos D, Tan DS, Jones RL, Judson IR (2010) Biological rationale and current clinical experience with anti-insulin-like growth factor 1 receptor monoclonal antibodies in treating sarcoma: twenty years from the bench to the bedside. *Cancer J* **16**: 183-194

Olsson M, Zhivotovsky B (2011) Caspases and cancer. *Cell Death Differ* **18**: 1441-1449

Ordóñez JL, Osuna D, Herrero D, de Alava E, Madoz-Gurpide J (2009) Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res* **69**: 7140-7150

Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**: 381-389

Pai SI, Westra WH (2009) Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* **4**: 49-70

Park BG, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Kim YK (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* **215**: 115-125

Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J (1993) International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer* **53**: 371-376

Patel HH, Insel PA (2009) Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxid Redox Signal* **11**: 1357-1372

Patra SK (2008) Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1785**: 182-206

Paulussen M, Bielack S, Jurgens H, Casali PG (2009) Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **20 Suppl 4**: 140-142

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-183

Pelengaris S KM (ed) (2013) *The Molecular Biology of Cancer: A bridge from the Bench to Bedside*: John Wiley & Sons, 632pp

Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, Delepine P, Montier T, Laud K, Tirode F, Delattre O, Heymann D, Redini F (2010) Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin Cancer Res* **16**: 2363-2374

Pizon M, Rampanarivo H, Tauzin S, Chaigne-Delalande B, Daburon S, Castroviejo M, Moreau P, Moreau JF, Legembre P (2011) Actin-independent exclusion of CD95 by PI3K/AKT signalling: implications for apoptosis. *Eur J Immunol* **41**: 2368-2378

Planting AS, Stoter G, Verweij J (1993) Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* **29A**: 518-519

Pluquet O, Hainaut P (2001) Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett* **174**: 1-15

Posadas EM, Gulley J, Arlen PM, Trout A, Parnes HL, Wright J, Lee MJ, Chung EJ, Trepel JB, Sparreboom A, Chen C, Jones E, Steinberg SM, Daniels A, Figg WD, Dahut WL (2005) A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **4**: 1133-1137

Potratz J, Dirksen U, Jurgens H, Craft A (2012) Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr Hematol Oncol* **29**: 1-11

Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and - independent cell death. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1589-1597

Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* **24**: 7275-7283

Rahmani M, Reese E, Dai Y, Bauer C, Payne SG, Dent P, Spiegel S, Grant S (2005) Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. *Cancer Res* **65**: 2422-2432

Rasola A, Bernardi P (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**: 222-233

Rautava J, Syrjänen S (2012) Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. *Head and Neck Pathology* **6**: 3-15

Raymond RW (ed) (2007) *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press, 530pp

Reis-Sobreiro M, Gajate C, Mollinedo F (2009) Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene* **28**: 3221-3234

Reis-Sobreiro M, Roue G, Moros A, Gajate C, de la Iglesia-Vicente J, Colomer D, Mollinedo F (2013) Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J* **3**: e118

Riedl S, Scott F (2009) Caspases: Activation, Regulation, and Function. In *Essentials of Apoptosis*, Dong Z, Yin X-M (eds), 1, pp 3-24. Humana Press

Ries L SM, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (eds). (1999) *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*,

, Vol. NIH Pub. No. 99-4649. .

Riggi N, Stamenkovic I (2007) The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* **254**: 1-10

Riggi N, Suva ML, Stamenkovic I (2009) Ewing's sarcoma origin: from duel to duality. *Expert Rev Anticancer Ther* **9**: 1025-1030

Ríos-Marco P, Martín-Fernández M, Soria-Bretones I, Ríos A, Carrasco MP, Marco C (2013) Alkylphospholipids deregulate cholesterol metabolism and induce cell-cycle arrest and autophagy in U-87 MG glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**: 1322-1334

Rodriguez D, Rojas-Rivera D, Hetz C (2011) Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1813**: 564-574

Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L, Hemmings B (2011a) Protein Kinase B (PKB/Akt), a Key Mediator of the PI3K Signaling Pathway. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease* Vol. 346, pp 31-56. Springer Berlin Heidelberg

Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Knight Z (2011b) Small Molecule Inhibitors of the PI3-Kinase Family. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease* Vol. 347, pp 263-278. Springer Berlin Heidelberg

Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Vasudevan K, Garraway L (2011c) AKT Signaling in Physiology and Disease. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease* Vol. 347, pp 105-133. Springer Berlin Heidelberg

Ross KA, Smyth NA, Murawski CD, Kennedy JG (2013) The biology of ewing sarcoma. *ISRN Oncol* **2013**: 759725

Rouschop KM, Dubois LJ, Keulers TG, van den Beucken T, Lambin P, Bussink J, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG (2013) PERK/eIF2 α signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 4622-4627

Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344

Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M (2003) Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* **14**: 167-173

Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H (2010) Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. *Antioxid Redox Signal* **15**: 205-218

Salido GM (2009) Oxidative Stress, Intracellular Calcium Signals and Apoptotic Processes. In *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasi*, Salido G, Rosado J (eds), 1, pp 1-16. Springer Netherlands

Sancho-Martínez SM, Piedrafita FJ, Cannata-Anda JB, López-Novoa JM, López-Hernández FJ (2011) Necrotic Concentrations of Cisplatin Activate the Apoptotic Machinery but Inhibit Effector Caspases and Interfere with the Execution of Apoptosis. *Toxicological Sciences* **122**: 73-85

Sankar S, Lessnick SL (2011) Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet* **204**: 351-365

Sano R, Reed JC (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 3460-3470

Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, Lollini PL, Lukas S, Benini S, Croci S, Perdichizzi S, Zambelli D, Serra M, Garcia-Echeverria C, Hofmann F, Picci P (2005) Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer Res* **65**: 3868-3876

Scotlandi K, Manara MC, Serra M, Marino MT, Ventura S, Garofalo C, Alberghini M, Magagnoli G, Ferrari S, Lopez-Guerrero JA, Llombard-Bosch A, Picci P (2011) Expression of insulin-like growth factor system components in Ewing's sarcoma and their association with survival. *Eur J Cancer* **47**: 1258-1266

Scotlandi K, Manara MC, Strammiello R, Landuzzi L, Benini S, Perdichizzi S, Serra M, Astolfi A, Nicoletti G, Lollini PL, Bertoni F, Nanni P, Picci P (2003) C-kit receptor expression in Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions. *J Clin Oncol* **21**: 1952-1960

Scotlandi K, Perdichizzi S, Bernard G, Nicoletti G, Nanni P, Lollini PL, Curti A, Manara MC, Benini S, Bernard A, Picci P (2006) Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* **42**: 91-96

Scherf HR, Schuler B, Berger MR, Schmahl D (1987) Therapeutic activity of ET-18-OCH₃ and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats. *Lipids* **22**: 927-929

Schröder M, Kaufman RJ. (2005) THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews Inc., Vol. 74, pp. 739-789.

Seifert K, Duchene M, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Scheiner O, Wiedermann G, Hottkowitz T, Eibl H (2001) Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1505-1510

Selivanov VA, Vizan P, Mollinedo F, Fan TW, Lee PW, Cascante M (2010) Edelfosine-induced metabolic changes in cancer cells that precede the overproduction of reactive oxygen species and apoptosis. *BMC Syst Biol* **4**: 135

Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990-995

Shore GC, Papa FR, Oakes SA (2010) Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 143-149

- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39
- Skulachev VP (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **11**: 473-485
- Smorenburg CH, Seynaeve C, Bontenbal M, Planting AS, Sindermann H, Verweij J (2000) Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs* **11**: 825-828
- Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, Freilino ML, Graner MW, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gooding WE, Furnari FB, Grandis JR (2006) Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* **12**: 5064-5073
- Sonnemann J, Trommer N, Becker S, Wittig S, Grauel D, Palani CD, Beck JF (2012) Histone deacetylase inhibitor-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in childhood malignancies is not associated with upregulation of TRAIL receptor expression, but with potentiated caspase-8 activation. *Cancer Biol Ther* **13**: 417-424
- Stadler ME, Patel MR, Couch ME, Hayes DN (2008) Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin North Am* **22**: 1099-1124, vii
- Stevenson MM. (2011) Head and Neck Cancer Treatment Protocols *Medscape Reference. Drugs, Disease and Procedures*, <http://emedicine.medscape.com/article/2006216-overview>.
- Stiller CA (2004) Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* **23**: 6429-6444
- Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, Casali PG (2013) Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: Report from the RARECARE project. *European Journal of Cancer* **49**: 684-695
- Subbiah V, Anderson P, Lazar AJ, Burdett E, Raymond K, Ludwig JA (2009) Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Curr Treat Options Oncol* **10**: 126-140
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M (2006) Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100 Suppl 1**: S26-33
- Suski JM, Lebedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR (2012) Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol* **810**: 183-205
- Syrjanen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M (2011) Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* **17 Suppl 1**: 58-72
- Tabas I, Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* **13**: 184-190

- Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH (1998) Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* **18**: 4793-4800
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y (1997) EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* **99**: 239-247
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* **445**: 77-88
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 231-241
- Tewari R, Sharma V, Koul N, Sen E (2008) Involvement of miltefosine-mediated ERK activation in glioma cell apoptosis through Fas regulation. *J Neurochem* **107**: 616-627
- Tischner D, Manzl C, Soratroi C, Villunger A, Krumschnabel G (2012) Necrosis-like death can engage multiple pro-apoptotic Bcl-2 protein family members. *Apoptosis* **17**: 1197-1209
- Toretsky JA, Steinberg SM, Thakar M, Counts D, Pironis B, Parente C, Eskenazi A, Helman L, Wexler LH (2001) Insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) and IGF binding protein-3 in patients with Ewing sarcoma family of tumors. *Cancer* **92**: 2941-2947
- Tran N, Rose BR, O'Brien CJ (2007) Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck* **29**: 64-70
- Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* **23**: 1889-1899
- Unger C, Damenz W, Fleer EA, Kim DJ, Breiser A, Hilgard P, Engel J, Nagel G, Eibl H (1989) Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncol* **28**: 213-217
- Uren A, Toretsky JA (2005) Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent. *Future Oncol* **1**: 521-528
- van Blitterswijk WJ, Verheij M (2008) Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* **14**: 2061-2074
- van Blitterswijk WJ, Verheij M (2012) Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1831**: 663-674
- van Blitterswijk WJ, Verheij M (2013) Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**: 663-674
- Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P (2010) Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* **17**: 922-930

- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 700-714
- Varela MR, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, Munoz DL, Robledo SM, Muskus CE, Lopez-Aban J, Muro A, Velez ID, Mollinedo F (2012) In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1612
- Veasey SC, Bányhegyi Gb, Margittai Áv, Csala Ms, Mandl Jz (2009) Redox Imbalance in the Endoplasmic Reticulum. In *Oxidative Neural Injury*, pp 45-64. Humana Press
- Verfaillie T, Garg AD, Agostinis P. (2013) Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Apoptosis Targeting Drugs in Cancer*, Vol. 332, pp. 249-264.
- Verfaillie T, Jäger R, Samali A, Agostinis P (2012) ER Stress Signaling Pathways in Cell Survival and Death. In *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*, Agostinis P, Afshin S (eds), 3, pp 41-73. Springer Netherlands
- Verma G, Datta M The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death. *J Cell Physiol* **227**: 1791-1795
- Vink SR, van der Luit AH, Klarenbeek JB, Verheij M, van Blitterswijk WJ (2007) Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **74**: 1456-1465
- Vlahovic G, Crawford J (2003) Activation of Tyrosine Kinases in Cancer. *The Oncologist* **8**: 531-538
- Vogler WR, Berdel WE, Geller RB, Brochstein JA, Beveridge RA, Dalton WS, Miller KB, Lazarus HM (1996) A phase II trial of autologous bone marrow transplantation (ABMT) in acute leukemia with edelfosine purged bone marrow. *Adv Exp Med Biol* **416**: 389-396
- Wagner BA, Buettner GR, Oberley LW, Burns CP (1998) Sensitivity of K562 and HL-60 cells to edelfosine, an ether lipid drug, correlates with production of reactive oxygen species. *Cancer Res* **58**: 2809-2816
- Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**: 537-549
- Weston CR, Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 142-149
- Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM (2011) Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 521-531
- White DE, Burchill SA Fenretinide-dependent upregulation of death receptors through ASK1 and p38alpha enhances death receptor ligand-induced cell death in Ewing's sarcoma family of tumours. *Br J Cancer* **103**: 1380-1390
- WHO- World Health Organization CdP. (2013) Nota Descriptiva Nº 237, Cáncer.

Won HS, Jung CK, Chun SH, Kang JH, Kim YS, Sun DI, Kim MS (2012) Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **48**: 985-990

Woolley PV, Schultz CJ, Rodriguez GI, Gams RA, Rowe KW, Jr., Dadey ML, Von Hoff DD, McPhillips JJ (1996) A phase II trial of ilmofosine in non-small cell bronchogenic carcinoma. *Invest New Drugs* **14**: 219-222

Wrangle J, Marur S, Forastiere A (2011) Biomarkers in Head and Neck Cancer. In *Head and Neck Cancer*, Bernier J (ed), 9, pp 157-167. Springer New York

Yao C, Wei JJ, Wang ZY, Ding HM, Li D, Yan SC, Yang YJ, Gu ZP (2013) Perifosine induces cell apoptosis in human osteosarcoma cells: new implication for osteosarcoma therapy? *Cell Biochem Biophys* **65**: 217-227

Yap TA, Sandhu SK, Workman P, de Bono JS (2010) Envisioning the future of early anticancer drug development. *Nat Rev Cancer* **10**: 514-523

Ye YC, Wang HJ, Yu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2012) RIP1-mediated mitochondrial dysfunction and ROS production contributed to tumor necrosis factor alpha-induced L929 cell necroptosis and autophagy. *Int Immunopharmacol* **14**: 674-682

Zeisig R, Arndt D, Stahn R, Fichtner I (1998) Physical properties and pharmacological activity in vitro and in vivo of optimised liposomes prepared from a new cancerostatic alkylphospholipid. *Biochim Biophys Acta* **1414**: 238-248

Zerp SF, Vink SR, Ruiter GA, Koolwijk P, Peters E, van der Luit AH, de Jong D, Budde M, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M (2008) Alkylphospholipids inhibit capillary-like endothelial tube formation in vitro: antiangiogenic properties of a new class of antitumor agents. *Anticancer Drugs* **19**: 65-75

Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp GL, Flavell RA, Choi AM, Lee PJ (2003) Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**: 305-315

Zhivotovsky B, Orrenius S (2011) Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium* **50**: 211-221

Zhou Z, Bolontrade MF, Reddy K, Duan X, Guan H, Yu L, Hicklin DJ, Kleinerman ES (2007) Suppression of Ewing's Sarcoma Tumor Growth, Tumor Vessel Formation, and Vasculogenesis Following Anti-vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Therapy. *Clinical Cancer Research* **13**: 4867-4873

Zhou Z, Lafleur EA, Koshkina NV, Worth LL, Lester MS, Kleinerman ES (2005) Interleukin-12 up-regulates Fas expression in human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells by enhancing its promoter activity. *Mol Cancer Res* **3**: 685-691

Zhu L, McManus MM, Hughes DP (2013) Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. *Front Oncol* **3**: 230

