



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

**BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA
A TAXANOS Y NUEVAS ALTERNATIVAS
TERAPÉUTICAS EN EL CÁNCER AVANZADO
DE MAMA Y PRÓSTATA**

M^a de la Luz Flores de Mera

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla
Sevilla, 2016



Dra. Carmen Sáez Torres y Dr. Miguel Ángel Japón Rodríguez,

CERTIFICAN:

Que M^a de la Luz Flores de Mera ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Bases moleculares de la resistencia a taxanos y nuevas alternativas terapéuticas en el cáncer avanzado de mama y próstata**” que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Fdo. M^a de la Luz Flores de Mera

Fdo. Carmen Sáez Torres

Fdo. Miguel Ángel Japón Rodríguez

Agradecimientos

Aprovecho este espacio para agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera han hecho posible la realización de la Tesis Doctoral. En primer lugar, quiero expresar mi especial gratitud a mis directores Carmen Sáez Torres y Miguel Ángel Japón Rodríguez por la oportunidad que me brindaron allá por el año 2008, a pesar de mi falta de experiencia laboral y mi “ignorancia” sobre lo que era trabajar en el mundo de la Ciencia.

A Miriam Echevarría, por aceptar ser mi tutora y facilitarme todos y cada uno de los trámites para los que se ha requerido su colaboración.

A todas aquéllas personas que han pasado por el laboratorio, incluso a aquéllos que no me han hecho el trabajo fácil porque de ellos he aprendido a superar las pruebas que te pone la vida... Por supuesto, a mis compañeras Cristina, Jessica y Rocío, por los buenos momentos y por aguantar los momentos de desesperación cuando las cosas se complican. Gracias con mayúsculas a Carolina, porque con ella he compartido lo mejor y también lo peor de estos años y lo hago con las mismas palabras que utilicé hace poco “Gracias por amar la Ciencia y por llevarla a cabo con rigurosidad, aunque eso implique tanto esfuerzo como paciencia. Gracias por compartirla conmigo sin reservas. Gracias por hacer que me embaucara, aún habiendo llegado a ella de rebote”. Todo lo bueno que te pase en la vida, siempre será poco.

A M^a Ángeles Poveda porque sé que estás sin estar, porque sé que si nos vieras a Caro y a mi convertidas en Doctoras te sentirías orgullosísima de nosotras, por hacerme feliz cada vez que venías a buscarme y me decías chiquitina con esa sonrisa pícara, por divertirme con tus anécdotas, por hacerte mi inseparable amiga de la plata, por las barritas energéticas y la fruta que me traías a los dos días de conocerme, porque como tu no hay dos.

A toda la gente del Servicio de Anatomía Patológica, a los que conocí como residentes y, durante mi periodo predoctoral, se han convertido en respetables patólogos como Rai, Elena, David, Manolo, Nieves, Olga, Fernando... a los que ya conocí como patólogos Lourdes, M^a Ángeles López, Begoña, Juanjo, Eloy... A los que en este tiempo dieron por finalizada su etapa de patólogos como Lolai, a los no patólogos del laboratorio de

molecular y del Biobanco, a las técnicas y a David Carballar, el mejor técnico de AP que el mundo ha dado. Gracias a tod@s por hacer de mis comidas risas interminables.

Como no, a mis niñas del máster. A Daniela “la italiana más flamenca”, a Emi “la trabajadora insaciable”, a Isa “la novia más guapa”, a Laura “mi paisana extremeña”, a M^a José “la sevillana más internacional” y a Vero “mi fiel compañera de desayunos y risas”. Gracias por celebrar conmigo desde Sevilla el día de Extremadura comiendo productos de mi tierra, por hacerme disfrutar de la feria de Abril, por alegraros con mis alegrías y por preocuparos por mí en mis malos momentos. Feliz de que el máster dure hasta estos días.

A mis amigas de toda la vida Cristi, Esther, Isa, Pipi, Rocío, Trini y Yeisa. Gracias porque a pesar de que nos vemos menos de lo deseado desde que me embarqué en esto, sé que estáis ahí para todo. A vuestras parejas y a vuestros retoños que me hacen pasar grandes momentos. Que suerte tengo de teneros.

A Chari, Cinthia, Lourdes, Noelia y Tania. Porque pasan los años y todo sigue igual. No puedo aguantar sin esas quedadas navideñas obligadas de las biolokas. Gracias por quererme así, gracias por hacerme pasar tan buenos momentos todos estos años.

A la familia Chunga, porque la impresión que tuve el día que os conocí, no fue la buena. Porque habéis tenido un gusto exquisito al regalarme a “mis saramaripanes” y a vuestros descendientes, porque hay fechas que sólo quiero pasar con vosotr@s. No pensé que os iba a querer tanto.

A mi familia, gracias a los que están siempre para todo y a los que si no están es porque no pueden o porque están por llegar, gracias a quien no tuvo más remedio que irse, porque supo quedarse en mí. A mi novio-marido con el que no comparto alianzas, pero sí lo mejor que hemos hecho juntos... mi niño, mi vida, mi César. GRACIAS POR LA VIDA QUE ME DAIS.

Gracias a todos los que os habéis cruzado en mi camino, gracias por hacer de mi lo que hoy soy.

Índice

Índice

Índice de figuras	VII
Índice de tablas	XI
Abreviaturas y acrónimos	XV
Introducción	1
1. Cáncer	3
1.1. Clasificación del cáncer según el tejido de origen	4
1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer	4
2. Cáncer de mama	6
2.1. Diagnóstico histopatológico del cáncer de mama	7
2.1.1. Tamaño tumoral	7
2.1.2. Subtipo histológico	7
2.1.3. Grado histológico	8
2.1.4. Afectación ganglionar	8
2.1.5. Expresión de receptores	8
2.1.6. Estadiaje del cáncer de mama	9
2.2. Tratamiento del cáncer de mama	10
2.2.1. Cirugía	11
2.2.2. Radioterapia	11
2.2.3. Tratamiento sistémico	11
3. Cáncer de próstata	13
3.1. Diagnóstico histopatológico del cáncer de próstata	13
3.1.1. Grado histológico	13
3.1.2. Estadiaje del cáncer de próstata	15
3.2. Tratamiento del cáncer de próstata	17
3.2.1. Terapia expectante y vigilancia activa	17
3.2.2. Cirugía	17
3.2.3. Radioterapia	17
3.2.4. Terapia hormonal o de privación de andrógenos	18
3.2.5. Quimioterapia no hormonal	19
4. Apoptosis	19
4.1. Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte	22

4.2.	Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial	23
4.2.1.	Familia de proteínas Bcl-2.....	23
5.	Microtúbulos como diana farmacológica	26
5.1.	Microtúbulos.....	26
5.2.	Drogas dirigidas a microtúbulos	28
5.2.1.	Paclitaxel	29
5.2.2.	Feniletil-isotiocianato (PEITC)	29
5.3.	Drogas dirigidas a microtúbulos y bloqueo del ciclo celular en mitosis	30
6.	Proteína quinasa C delta (PKC δ).....	33
	Objetivos.....	37
	Material y métodos.....	41
1.	Cultivo de líneas celulares.....	43
1.1.	Tripsinización.....	43
1.2.	Congelación de células	43
1.3.	Descongelación de células	43
2.	Ensayos de inducción de apoptosis.....	44
2.1.	Cálculo del porcentaje de PARP clivada.....	44
2.2.	Tinción y cuantificación de cuerpos apoptóticos.....	44
3.	Ensayos de silenciamiento génico.....	45
4.	Ensayos clonogénicos	45
5.	Western blot.....	46
5.1.	Anticuerpos utilizados para Western blot	47
6.	Ensayos de inmunoprecipitación.....	48
7.	Preparación de geles de acrilamida.....	49
8.	Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo	50
9.	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	51
10.	Pacientes	52
10.1.	Pacientes con cáncer de mama.....	52
10.2.	Pacientes con cáncer de próstata.....	52
11.	Inmunohistoquímica	52
12.	Análisis estadístico	53

1. Resultados en cáncer de mama _____; **Error! Marcador no definido.**

1.1. Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y T-47D presentan diferente sensibilidad a paclitaxel.....; **Error! Marcador no definido.**

1.2. Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 sufren deslizamiento tras tratamiento con paclitaxel, mientras que las células de cáncer de mama T-47D permanecen bloqueadas en mitosis tras tratamiento con paclitaxel; **Error! Marcador no definido.**

1.3. El tratamiento con paclitaxel induce cambios en los niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y T-47D; **Error! Marcador no definido.**

1.4. Mantenimiento de la interacción entre Bcl-xL y Bak en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, pero no en las células de cáncer de mama T-47D tras tratamiento con paclitaxel; **Error! Marcador no definido.**

1.5. El PEITC sensibiliza a las células de cáncer de mama MDA-MB-231 a la apoptosis inducida por paclitaxel bloqueando las células en G₂/M e impidiendo su salida de mitosis mediante deslizamiento; **Error! Marcador no definido.**

1.6. El PEITC es capaz de de bloquear el deslizamiento inducido por el tratamiento con paclitaxel en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231; **Error! Marcador no definido.**

1.7. El PEITC inhibe la apoptosis inducida por el paclitaxel en la línea celular de cáncer de mama T-47D; **Error! Marcador no definido.**

1.8. Análisis de expresión inmunohistoquímica de Bcl-xL en pacientes con cáncer de mama y su asociación con respuesta a la quimioterapia con paclitaxel.....; **Error! Marcador no definido.**

2. Resultados en cáncer de próstata _____; **Error! Marcador no definido.**

2.1. El silenciamiento de PKC δ induce una parada robusta en mitosis en las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP tratadas con paclitaxel; **Error! Marcador no definido.**

2.2. El silenciamiento génico de PKC δ disminuye la apoptosis inducida por paclitaxel mediante modulación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP; **Error! Marcador no definido.**

2.3. PKC δ regula la degradación de Mcl-1 mediante la modulación negativa de la vía Wnt/ β -catenina en las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y LNCaP; **Error! Marcador no definido.**

2.4. El inhibidor de Akt, LY294002, sensibiliza a las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y LNCaP a la apoptosis inducida por paclitaxel, incluso en células

silenciadas para PKC δ , a través de la inhibición de las vías de señalización de Akt y β -catenina **¡Error! Marcador no definido.**

2.5. El inhibidor de β -catenina, XAV939, sensibiliza a las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y LNCaP a la apoptosis inducida por paclitaxel, incluso en células silenciadas para PKC δ , a través de la inhibición de las vías de señalización de β -catenina y Akt **¡Error! Marcador no definido.**

2.6. El tratamiento secuencial con LY294002 o XAV939 seguido de paclitaxel bloquea la capacidad clonogénica de las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP, incluso tras el silenciamiento de PKC δ **¡Error! Marcador no definido.**

2.7. Análisis de expresión inmunohistoquímica de PKC δ , β -catenina activa, Aurora quinasa A, fosfo-GSK3 β y Mcl-1 en tejidos de cáncer de próstata humano. **¡Error! Marcador no definido.**

Discusión _____ **¡Error! Marcador no definido.**

1. Discusión de los resultados en cáncer de mama ____ **¡Error! Marcador no definido.**

2. Discusión de los resultados en cáncer de próstata__ **¡Error! Marcador no definido.**

Conclusiones _____ **¡Error! Marcador no definido.**

Bibliografía _____ 59

Anexo I. Recetas _____ 1321

Anexo II. Publicaciones _____ 139

Índice de figuras

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática simplificada de la base molecular del cáncer	3
Figura 2. Incidencia de las formas más comunes de cáncer por sexo	5
Figura 3. Mortalidad de las formas más comunes de cáncer por sexo	6
Figura 4. Sistema de puntuación de Gleason.....	15
Figura 5. Cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis.....	20
Figura 6. Estructura y activación de caspasas	21
Figura 7. Esquema de la vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte.....	22
Figura 8. Estructura y clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2.....	23
Figura 9. Esquema de la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial	25
Figura 10. Estructura de los microtúbulos.....	27
Figura 11. Dinámica de los microtúbulos, modelo del tapón de tubulina-GTP.....	27
Figura 12. Estado de activación y función del SAC durante el ciclo celular	31
Figura 13. Destinos posibles de células tratadas con drogas dirigidas a microtúbulos	33
Figura 14. Estructura primaria de las isoenzimas de la familia PKC.....	34
Figura 15. Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y T-47D presentan distinta sensibilidad a la apoptosis inducida por paclitaxel.....	57
Figura 16. El tratamiento con paclitaxel induce deslizamiento en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y parada robusta en mitosis en las células T-47D.....	60
Figura 17. El paclitaxel induce cambios en los niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y T-47D.....	61
Figura 18. La interacción la proteína antiapoptótica Bcl-xL y la proapoptótica Bak se mantiene en células de cáncer de mama MDA-MB-231, mientras que se rompe en células T-47D tras tratamiento con paclitaxel.....	63
Figura 19. El PEITC sensibiliza a la apoptosis inducida por paclitaxel en células de cáncer de mama MDA-MB-231	65
Figura 20. El PEITC impide el deslizamiento inducido por el paclitaxel en células de cáncer de mama MDA-MB-231	67
Figura 21. La combinación de PEITC 10 μ M durante 24 horas seguido de paclitaxel 1 μ M durante 48 horas es capaz de contrarrestar el deslizamiento inducido por el paclitaxel 1 μ M en monoterapia durante 48 horas en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231....	69
Figura 22. El PEITC bloquea la apoptosis inducida por paclitaxel en las células de cáncer de	

mama T-47D	72
Figura 23. Las pacientes de cáncer de mama con tumores que expresan altos niveles de Bcl-xL, presentan un menor tiempo libre de enfermedad tras el tratamiento con un régimen quimioterápico que incluye paclitaxel.....	74
Figura 24. La ausencia de PKC δ bloquea la salida de mitosis tras tratamiento con paclitaxel en la línea celular de cáncer de próstata PC3	76
Figura 25. El silenciamiento de PKC δ induce una parada más robusta en mitosis tras tratamiento con paclitaxel en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP.....	77
Figura 26. El silenciamiento de PKC δ induce resistencia a paclitaxel en las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y LNCaP y modula la expresión de varias proteínas de la familia Bcl-2	79
Figura 27. PKC δ regula los niveles de expresión de Mcl-1 mediante la modulación negativa de la vía Wnt/ β -catenina en células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP.....	81
Figura 28. El tratamiento con paclitaxel inhibe las vías de señalización Wnt/ β -catenina y Akt en células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP silenciadas o no para PKC δ	83
Figura 29. El inhibidor de Akt, LY294002, bloquea las vías de señalización Akt y β -catenina en las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP	84
Figura 30. El LY294002, inhibidor deAkt, sensibiliza a la apoptosis inducida por paclitaxel, incluso en las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP silenciadas para PKC δ	86
Figura 31. El inhibidor de β -catenina, XAV939, bloquea las vías de señalización de β -catenina y Akt en las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP.....	88
Figura 32. El XAV939, inhibidor de la β -catenina, sensibiliza a la apoptosis inducida por paclitaxel, incluso en las células de cáncer de próstata PC3 y LNCaP silenciadas para PKC δ	89
Figura 33. El tratamiento secuencial con LY294002 o XAV939 seguido de paclitaxel disminuye la capacidad clonogénica de las células de cáncer de próstata PC3	92
Figura 34. El tratamiento secuencial con LY294002 o XAV939 seguido de paclitaxel disminuye la capacidad clonogénica de las células de cáncer de próstata LNCaP	93
Figura 35. Expresión inmunohistoquímica de las proteínas PKC δ , β -catenina activa, Aurora quinasa A, fosfo GSK3 β ^{Ser9} y Mcl-1 en pacientes con cáncer de próstata.....	94
Figura 36. Modelo que ilustra la forma en que PKC δ regula la degradación de Mcl-1 mediante la modulación negativa de la vía de señalización Wnt/ β -catenina	111

Índice de tablas

Índice de tablas

Tabla 1. Estadíaaje del cáncer de mama	10
Tabla 2. Estadíaaje del cáncer de próstata	16
Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados para Western blot	47
Tabla 4. Correlación entre la expresión de PKC δ , β -catenina activa, Aurora quinasa A, fosfo-GSK3 β ^{Ser9} y Mcl-1 con el grado de Gleason y entre sí.....	96

Abreviaturas y acrónimos

Akt: “Ak” es el nombre de clasificación de una cepa de ratones que desarrollaron timomas espontáneamente. “t” viene de timoma.

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptóticas (en inglés, Apoptotic Protease Activating Factor-1)

APC/C: Complejo promotor de anafase/ciclosoma (en inglés, Anaphase Promoting Complex/Cyclosome)

Apo3L: Ligando de Apo3 (en inglés, Apo3 Lingand)

APS: Persulfato amónico (en inglés, Amonium Persulfate)

AURKA: Aurora quinasa A

Bad: Proteína agonista de muerte celular asociada a Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 associated agonist of cell death protein)

Bak: Proteína destructora del antagonista homólogo Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 antagonist killer 1 protein)

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2 (en inglés, Bcl-2-associated x protein)

Bcl-2: Proteína de linfoma de células B (en inglés, B-cell lymphoma 2 protein)

Bcl-w o Bcl2l2: Proteína como Bcl-2 (en inglés, Bcl-2-like-2 protein)

Bcl-xL: Proteína extra grande del linfoma de células B (en inglés, B-cell lymphoma extra large protein)

Bcl-xS: Proteína extra pequeña del linfoma de células B (en inglés, B-cell lymphoma extra short protein)

Bim: Proteína mediadora de muerte celular por interacción con Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 interacting mediator of cell death protein)

Bid: Proteína agonista de muerte por dominios de interacción con Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 interacting domain death agonist protein)

¡Bid: Bid truncado (en inglés, truncated Bid)

Bik: Proteína de muerte por interacción con Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 interacting killer protein)

Bmf: Factor modificador de Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 modifying factor)

Bok: Proteína de muerte relacionada con Bcl-2 asociada al ovario (en inglés, Bcl-2-related ovarian killer)

Bub3: en inglés, Budding uninhibited by benzimidazoles 3

BubR1: en inglés, Budding uninhibited by benzimidazoles R1

CARD: Dominio de activación y reclutamiento de caspasas (en inglés, Caspase Activation and Recruitment Domain)

Cdc20: en inglés, Cell-division cycle 20

Cdk1: Quinasa dependiente de ciclina 1 (del inglés, Cyclin-dependent kinase1)

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilammonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol (en inglés, 4',6-diamidino-2-phenylindole)

DD: Dominio de muerte (en inglés, Death Domain)

DED: Dominio efector de muerte (en inglés, Death Effector Domain)

DHT: Dihidrotestosterona

DISC: Complejo señalizador de inducción de muerte (en inglés, Death-Inducing Signaling Complex)

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dominio BH: Dominio de homología con Bcl-2 (en inglés, Bcl-2 hology domain)

Dominio TM: Dominio transmembrana

DRE: Examen digital de recto (en inglés, Digital Rectal Examination)

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (en inglés, Ethylenediaminetetraacetic Acid)

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas (en inglés, Fas-Associated Death Domain)

Fas: Fragmento estimulador de la apoptosis (en inglés, Apoptosis Stimulating Fragment)

FasL: Ligando de Fas (en inglés, Fas Ligand)

FBS: Suero fetal bovino (en inglés, Fetal Bovine Serum)

FEC: 5-Fluoruracilo, epirrubicina y ciclofosfamida

FECP: FEC más paclitaxel

FISH: Hibridación fluorescente *in situ* (en inglés, Fluorescent *in situ* Hybridization)

GDP: Guanosina-difosfato (en inglés, Guanosine diphosphate)

GSK3β: Glucógeno sintasa quinasa 3 beta (en inglés, Glycogen Synthase Kinase 3 beta)

GTP: Guanosina-trifosfato (en inglés, Guanosine triphosphate)

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etanosulfónico

HER2: Receptor de factor del crecimiento epidérmico humano 2 (en inglés, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

HRK: Proteína Harakiri

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal (en inglés, c-Jun N-terminal Kinases)

Mad2: en inglés, Mitotic arrest deficient 2

Mcl-1: Proteína de la leucemia de células mieloides 1 (en inglés, Myeloid cell leukemia sequence 1)

Noxa: daño en latín

NP-40: Nonidet P-40

NRS: Suero normal de conejo (en inglés, Normal Rabbit Serum)

PI3K: Fosfatidil-inositol-3 quinasa (en inglés, Phosphatidylinositol 3-kinase)

PARP: poli-(ADP-ribosa)-polimerasa

PBD: Detergente en tampón fosfato (en inglés, Phosphate Buffer Detergent)

PBS: Tampón fosfato salino (en inglés, Phosphate Buffer Saline)

PEITC: Feniletil-isotiocianato (en inglés, Phenylethyl-Isothiocyanate)

PKC: Proteína quinasa C (en inglés, Protein Kinase C)

PSA: Antígeno prostático específico (en inglés, Prostatic Specific Antigen)

Pttg1: Gen transformante de tumores pituitarios (en inglés, Pituitary Tumor Transforming Gene)

Puma: en inglés, p53 up-regulated modulator of apoptosis

RE: Receptor de estrógenos

RP: Receptor de progesterona

SAC: Punto de control del huso mitótico (en inglés, Spindle Assembly Checkpoint)

SDS: Dodecil sulfato (en inglés, Sodium Dodecyl Sulfate)

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (en inglés, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

siRNA: RNA pequeño de interferencia (en inglés, Small Interfering RNA)

SSC: Citrato sódico salino (en inglés Saline Sodium Citrate)

STAT1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1 (en inglés, Signal Transducer and Activator of Transcription 1)

TBS: Tampón tris salino (en inglés, Tris Buffered Saline)

TEMED: N,N,N',N-tetraetilendiamina

TNF: Factor de necrosis tumoral (en inglés, Tumor Necrosis Factor)

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral (en inglés Tumor Necrosis Factor Receptor)

TRADD: Dominio de muerte asociado a TNFR (en inglés, TNFR-Associated Death Domain)

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (en inglés, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand).

TRAILR: Receptor de TRAIL (en inglés, TRAIL Receptor)

Wnt: Sitio de integración relacionado con “Wingless” (del inglés, Wingless-related integration site)

Introducción

1. Cáncer

El término cáncer engloba un grupo numeroso y heterogéneo de enfermedades malignas, con origen genético monoclonal, caracterizadas por una pérdida en el control de la proliferación celular de un determinado tejido donde las células se dividen sin regulación. Mientras que las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado, las células cancerosas se dividen casi sin límite y esto conduce a la formación de unas masas celulares denominadas tumores o neoplasias. Además, estas células cancerosas pueden adquirir la capacidad de migrar e invadir otros tejidos u órganos circundantes o distantes a través del torrente sanguíneo o linfático dando lugar a las metástasis [1] (Figura 1).

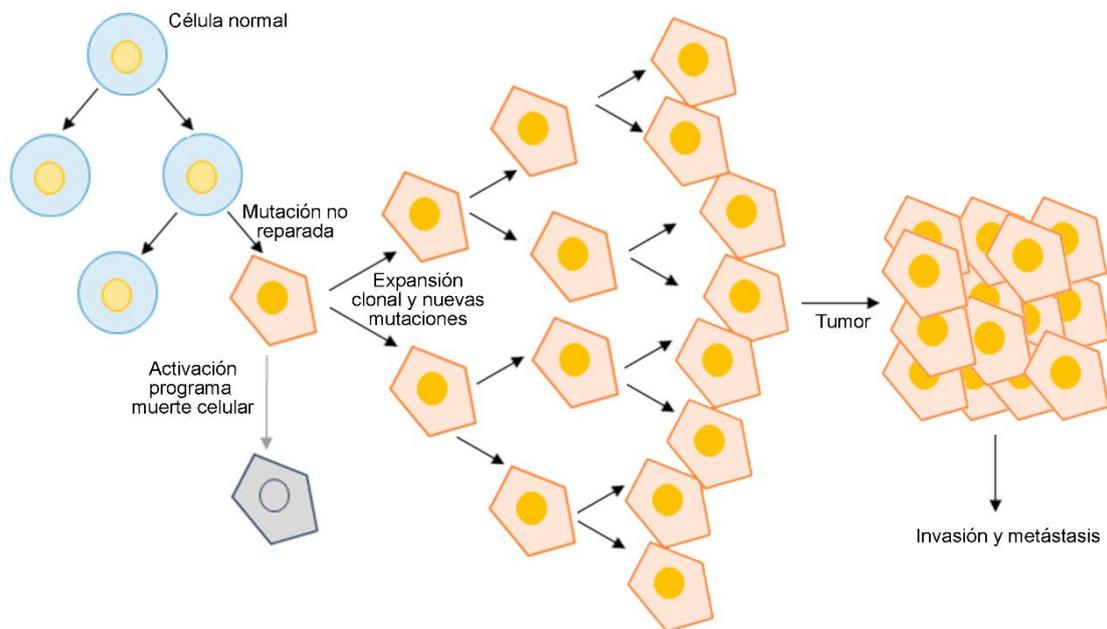


Figura 1. Representación esquemática simplificada de la base molecular del cáncer. Las células normales se caracterizan por dividirse de forma controlada, cuando estas células adquieren mutaciones que no pueden ser reparadas, activan su propio programa de muerte. En ocasiones, las células portadoras de mutaciones no reparadas, evaden el programa de muerte celular y comienzan a proliferar de manera descontrolada acumulando nuevas mutaciones, esto se conoce con el nombre de progresión tumoral. Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de migrar e invadir tejidos adyacentes o distantes dando lugar a la aparición de metástasis. Adaptado de Pocket companion to Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease [1].

1.1. Clasificación del cáncer según el tejido de origen

El tipo de cáncer se define, entre otras cosas, por el tejido u órgano en el que se originó, pero de forma general se agrupan por el tipo de tejido que les dio origen [1]. En base a esto se clasifican en:

- **Carcinomas.** Son cánceres originados a partir de células epiteliales, es decir, células que tapizan la superficie de órganos, glándulas o estructuras corporales. Representan el 80% de la totalidad de los cánceres e incluyen las variedades más comunes de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, páncreas y estómago.
- **Sarcomas.** Se trata de tumores originados a partir de células mesenquimales de las que derivan músculos, huesos, cartílagos y tejido graso. Los más frecuentes son los sarcomas óseos.
- **Leucemias.** Son cánceres originados a partir de las células de la médula ósea.
- **Linfomas.** Estos cánceres tienen su origen en las células de ganglios u órganos linfáticos.

1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer

El cáncer es actualmente una de las enfermedades con mayor incidencia, prevalencia y mortalidad a nivel global. Según el estudio GLOBOCAN 2012 llevado a cabo por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, el cáncer es ya la principal causa de muerte en los países occidentales, y se convertirá en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las próximas décadas en todas las regiones del mundo, independientemente de su nivel de desarrollo [2]. Todo esto convierte al cáncer en un problema de salud prioritario y se hace necesaria una acción global para frenar la creciente carga del cáncer [3].

En términos de tasas de incidencia ajustadas por la edad en hombres, se estima que entre los cánceres más frecuentemente diagnosticados en el mundo, se encuentran el cáncer de próstata (en países occidentales y en países de África central y del sur), el cáncer de pulmón (en Europa del este y Asia) y el cáncer de hígado (en países del este de África y del sureste de Asia). En mujeres, los más frecuentemente diagnosticados son el cáncer

de mama (en la mayoría de países) y el cáncer de cuello uterino (la mayoría en países africanos) [3] (Figura 2).

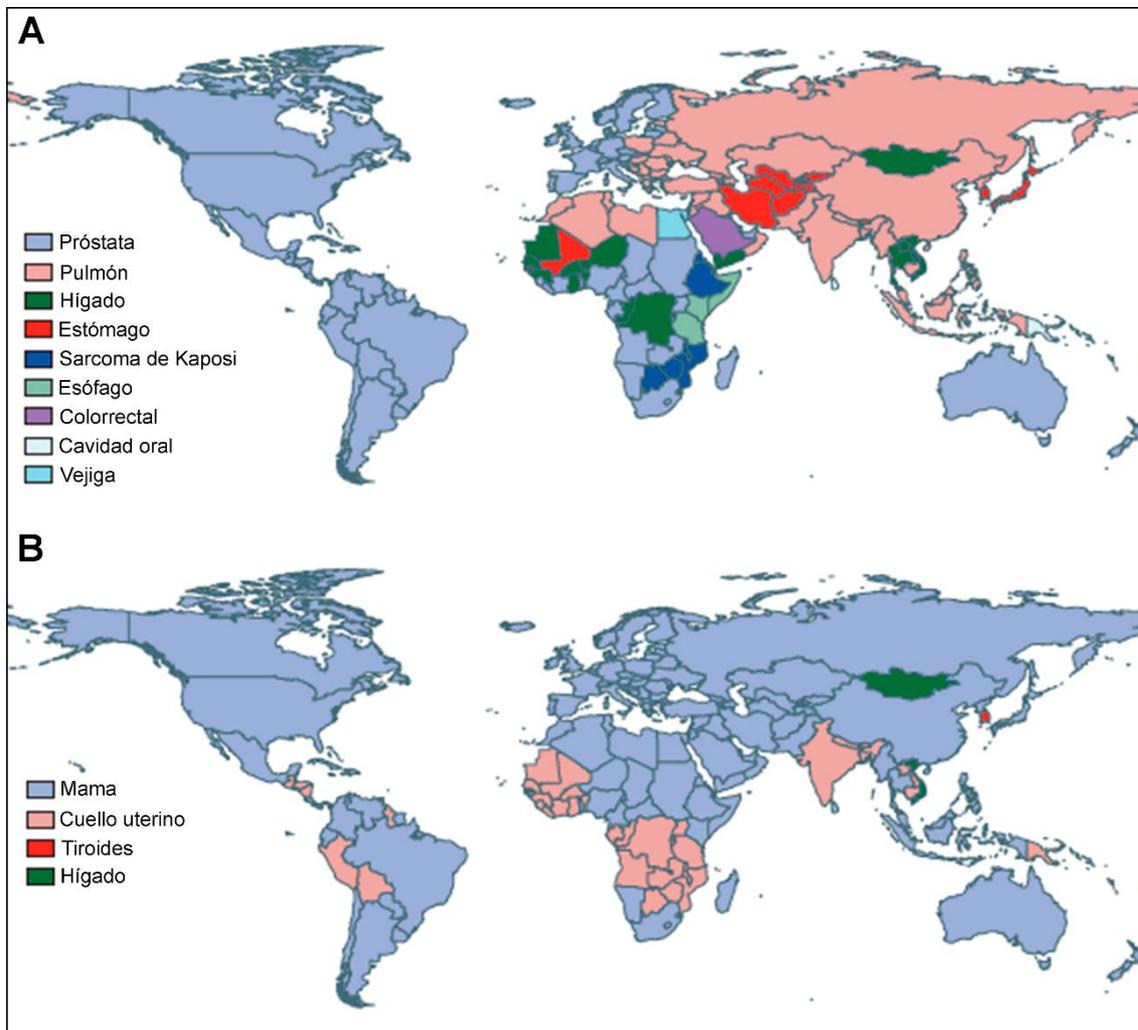


Figura 2. Incidencia de las formas más comunes de cáncer por sexo. (A) Incidencia en hombres. **(B)** Incidencia en mujeres. El mapa solo muestra los países incluidos en el análisis. Adaptado de Bray et al., 2012 [3].

En términos de mortalidad ajustada por la edad, el cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer en hombres, seguido del cáncer de próstata y del cáncer de hígado. En las mujeres, el cáncer de mama constituye la causa de muerte más común por cáncer, seguido del cáncer de cuello uterino y del cáncer de pulmón (Figura 3) [3].

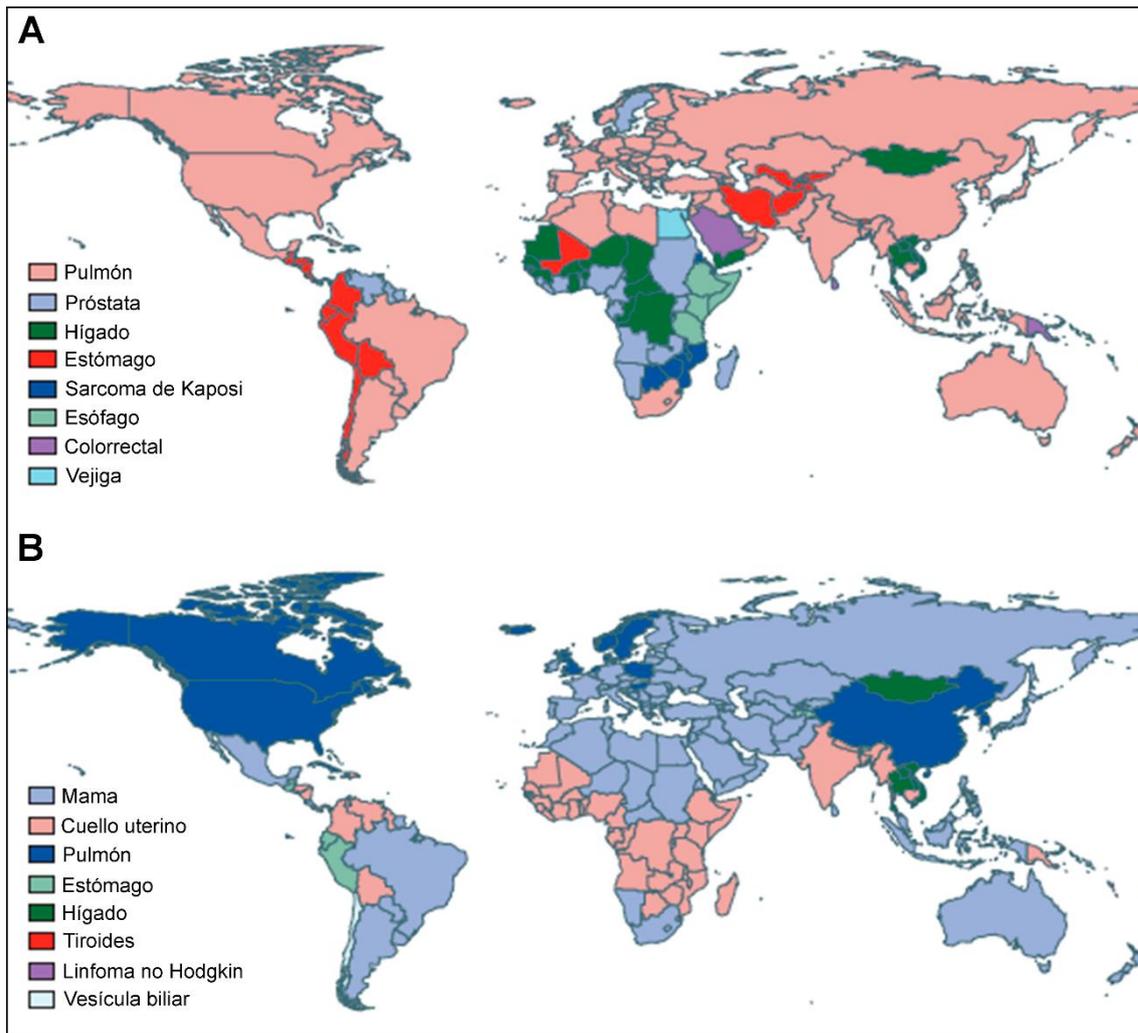


Figura 3. Mortalidad de las formas más comunes de cáncer por sexo. (A) Mortalidad en hombres. (B) Mortalidad en mujeres. El mapa solo muestra los países incluidos en el análisis. Adaptado de Bray et al., 2012 [3].

2. Cáncer de mama

Como hemos mencionado anteriormente, el cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres, según las estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer que hacen referencia al año 2012 [2], cada año se diagnostican 1,68 millones de casos nuevos en la población femenina mundial y unos 26.000 nuevos casos en España [4].

A pesar de que la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama es alta y sigue una evolución ascendente en el tiempo, el cáncer de mama continúa siendo un problema de salud muy relevante ya que, en España se produjeron unas 6000 muertes en

el año 2006 y las estimaciones indican que en el año de 2013 se han producido más de 6600 muertes a causa del cáncer de mama [4, 5].

Las pacientes con cáncer de mama metastásico en el momento del diagnóstico suponen aproximadamente el 5%, pero en torno al 30% de las mujeres con diagnosticadas con cáncer de mama en estadio inicial desarrollarán metástasis a distancia durante la evolución de la enfermedad [6].

2.1. Diagnóstico histopatológico del cáncer de mama

Actualmente, el diagnóstico histopatológico del cáncer de mama ha pasado de ser morfológico-descriptivo, a identificar una serie de factores pronósticos y predictivos que permiten tomar decisiones en el tratamiento del cáncer de mama. Los factores pronósticos son aquellas características del tumor o del paciente que pueden predecir la historia natural de la enfermedad, recidivas y supervivencia de las pacientes. Sin embargo, los factores predictivos son aquellas características del tumor que indican la respuesta a un determinado régimen quimioterápico [7].

2.1.1. Tamaño tumoral

El tamaño del tumor correlaciona de manera directa con la supervivencia y con la afectación ganglionar en la paciente [8]. Aquellos carcinomas que miden menos de 0.5 centímetros de diámetro tienen menos riesgo de tener metástasis en ganglio que los carcinomas que miden más de 0.6 centímetros de diámetro [9-11]. De manera similar, se ha reportado un mayor tiempo libre de enfermedad en aquellas pacientes con carcinomas de menos de 1 centímetro de diámetro [12].

2.1.2. Subtipo histológico

El subtipo histológico viene determinado por las células de las que deriva el tumor [1]. Podemos distinguir:

- **Carcinoma ductal.** Es el subtipo más frecuente y deriva de las células que forman los conductos lácteos.
- **Carcinoma lobulillar.** Este subtipo deriva de las células de los lóbulos, donde se produce la leche.

2.1.3. Grado histológico

El grado histológico es determinado por el patólogo utilizando el sistema de Nottingham o sistema de Scarff-Bloom-Richardson modificado [13], que asigna un grado a los tumores basándose en la capacidad de las células tumorales para formar túbulos, en el grado nuclear de las células tumorales y en el rango mitótico de las células tumorales. A cada una de las categorías anteriores se les asigna una puntuación del 1 al 3, una puntuación de 1 indica que las células tumorales se asemejan a las células del tejido normal, y una puntuación de 3 indica que las células tumorales y las células del tejido normal son muy diferentes. En base a esto, los tumores obtienen una calificación de entre 3 y 9 puntos y se clasifican en:

- **Bien diferenciados o grado 1.** La calificación final de estos tumores es de 3-5 puntos.
- **Moderadamente diferenciados o grado 2.** La puntuación final del tumor está comprendida entre 6 y 7.
- **Poco diferenciados o grado 3.** Son tumores con una puntuación definitiva de más de 8.

El mayor grado histológico correlaciona con mayor frecuencia de metástasis, recurrencia tumoral, muerte por enfermedad metastásica, menor tiempo libre de enfermedad y menor supervivencia [14, 15].

2.1.4 Afectación ganglionar

En la actualidad, el mejor indicador pronóstico en pacientes con cáncer de mama en estadio inicial es la presencia o ausencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares. La recurrencia de la enfermedad es mayor en las pacientes con afectación ganglionar, a mayor número de ganglios afectados, peor es el pronóstico de la enfermedad [16]. La afectación ganglionar se analiza mediante la técnica del ganglio centinela, que consiste en extraer el primer ganglio que recibe el drenaje linfático del tumor y ver si está afectado por el tumor.

2.1.5 Expresión de receptores

La proliferación de las células tumorales que expresan receptores de estrógenos (RE) o de progesterona (RP) depende, al menos en parte, de dichas hormonas para proliferar. Por otro lado, las células tumorales pueden sobreexpresar el receptor

HER2/neu (Receptor del factor de crecimiento humano 2), producto del proto-oncogen ERBB2, que regula la proliferación celular en la mama. Dependiendo de la expresión de estos receptores, se establece la siguiente clasificación del cáncer de mama:

- **Receptores hormonales positivos.** Son tumores positivos para RE y/o RP. Los patrones de expresión genética de estos cánceres son similares a los de las células normales que recubren los conductos y las glándulas de la mama. Son los tumores de mama con mejor pronóstico y, en general, responden muy bien a la terapia hormonal [17].
- **HER2 positivo.** Son tumores con amplificación del gen HER2, constituyen aproximadamente el 20% de los cánceres de mama y suelen tener una apariencia de alto grado, un crecimiento rápido y un peor pronóstico, aunque pueden ser tratados con éxito con terapias específicas anti-HER2 [18].
- **Triple positivo.** Son tumores positivos para RE y RP que, además, sobreexpresan HER2 por lo que pueden ser tratados con terapia hormonal o con terapia dirigidas contra HER2.
- **Triple negativo.** Son tumores que carecen de RE y RP y no tienen amplificado HER2. La expresión genética de estos tumores es similar a la de las células basales de los conductos y las glándulas de la mama. Se trata de tumores de alto grado, con crecimiento rápido y un pronóstico desfavorable. La única opción terapéutica es la quimioterapia, ya que ni la terapia hormonal ni la terapia dirigida a HER2 son eficaces contra estos cánceres [19].

2.1.6 Estadiaje del cáncer de mama

Todos los subtipos de cáncer de mama se clasifican en estadios según la extensión de la enfermedad. Se utiliza el sistema de clasificación TNM basado en el tamaño del tumor (T), a la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y en la aparición de metástasis en otras partes del cuerpo (M).

Estadio 0 o carcinoma <i>in situ</i>.
Son lesiones premalignas, las células tumorales se localizan exclusivamente en la pared de los lóbulos mamarios (carcinoma lobulillar <i>in situ</i>) o de los conductos mamarios (carcinoma ductal <i>in situ</i> o intraductal). Aunque no suelen ser invasivos si se dejan evolucionar pueden convertirse en un carcinoma infiltrante.
Estadio I.
Incluye aquellos tumores que miden menos de 2 centímetros, sin diseminación a ganglios linfáticos axilares ni metástasis a distancia.
Estadio II. Incluye los siguientes tumores:
- Tumores de pequeño tamaño, diámetro menor de 2 centímetros, con afectación de los ganglios linfáticos axilares. - Tumores de tamaño mediano, diámetro de entre 2 y 5 centímetros, con independencia de la afectación de los ganglios linfáticos axilares. - Tumores de gran tamaño, diámetro mayor de 5 centímetros, sin afectación de los ganglios linfáticos axilares.
Estadio III o localmente avanzado. Dentro de este estadio se hacen 3 subdivisiones:
Estadio IIIA. Incluye los siguientes supuestos: - Tumores de menos de 5 centímetros que se han diseminado a ganglios linfáticos axilares, de manera palpable, o a ganglios linfáticos situados en el mediastino. - Tumores de más de 5 centímetros que se han diseminado a ganglios linfáticos axilares o a ganglios linfáticos situados en el mediastino.
Estadio IIIB. Incluye todos aquellos tumores que, independientemente del tamaño afectan a la pared del tórax o a la piel de la mama.
Estadio IIIC. Incluye a tumores que independientemente del tamaño tengan: - Afectación de más de 10 ganglios linfáticos axilares. - Afectación de ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos situados en el mediastino. - Afectación de ganglios linfáticos situados por encima o por debajo de la clavícula.
Estadio IV.
Incluye todos aquellos tumores que han diseminado a otras partes del cuerpo, afectando a otros órganos como hueso o hígado

Tabla 1. Estadiaje del cáncer de mama.

2.2. Tratamiento del cáncer de mama

El cáncer de mama presenta una gran heterogeneidad por lo que el tratamiento del mismo se basa en multitud de factores y debe individualizarse. Por lo general, a la mayoría de las pacientes se les practicará algún tipo de cirugía que, a menudo, se combinará con radioterapia, quimioterapia o terapia hormonal. Clásicamente se iniciaba con la cirugía para después administrar el tratamiento sistémico y la radioterapia, pero en la actualidad se puede iniciar con la radioterapia y el tratamiento sistémico para permitir una cirugía más conservadora en las pacientes.

2.2.1. Cirugía

El principal objetivo de la cirugía es la extirpación del tumor y el análisis de los ganglios axilares. En pacientes con cáncer de mama localizado, puede llevarse a cabo dos tipos de cirugía:

- **Cirugía conservadora.** Implica la extirpación del tumor junto con una pequeña cantidad del tejido sano circundante y, en general, va acompañada de la administración de radioterapia con objeto de eliminar aquellas células tumorales que pudieran quedar tras la cirugía.
- **Mastectomía.** Implica la extirpación completa de la mama.

Los ganglios linfáticos axilares son de los primeros que se afectan por la diseminación de la enfermedad y por ello, durante la cirugía se extirpa el ganglio centinela para ver si está afectado o no por el tumor y realizar una linfadenectomía cuando sea necesario.

2.2.2. Radioterapia

La radioterapia se basa en el uso de rayos X de alta energía o de otros tipos de radiación para destruir las células tumorales o para impedir su crecimiento. Puede utilizarse como tratamiento adyuvante para eliminar células tumorales que pudieran haber quedado tras la cirugía o como tratamiento paliativo para aliviar el dolor que produce la afectación ósea o ganglionar o la presión craneal producida por alguna metástasis cerebral. Existen dos tipos de radioterapia y se aplica una u otra dependiendo del tumor [20].

- **Radioterapia externa.** Una máquina envía la radiación desde el exterior del cuerpo hacia el área donde se localiza el tumor.
- **Radioterapia interna o braquiterapia.** Implica el uso de sustancias radiactivas que se aplican directamente en el área donde se localiza el tumor.

2.2.3. Tratamiento sistémico

El tratamiento sistémico, a diferencia de la cirugía o la radioterapia, actúa sobre todo el organismo ya que se administra vía intravenosa u oral. Este tipo de terapia se administra en estadios iniciales del cáncer de mama o como tratamiento adyuvante como en la fase de enfermedad metastásica.

El tratamiento sistémico en adyuvancia tiene como objetivo evitar que en un futuro puedan aparecer metástasis derivadas de células tumorales que pudieran haber quedado tras la cirugía y reducir así el riesgo de recaída y de muerte de las pacientes con cáncer de mama. Existen diferentes formas de tratamiento adyuvante y el uso de una u otra depende del pronóstico de la enfermedad y del tipo de cáncer de mama.

- **Terapia hormonal.** Sólo se indica si el tumor es positivo para receptores hormonales y, habitualmente, se administra tras finalizar la quimioterapia. Según el Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM), en mujeres premenopáusicas se recomienda el uso de tamoxifeno en monoterapia o combinado con análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante. En mujeres postmenopáusicas se recomienda el uso de inhibidores de la aromataza de tercera generación como el letrozole [21].
- **Terapias dirigidas.** Actualmente la única terapia dirigida que se usa en adyuvancia en el cáncer de mama es el trastuzumab, una terapia anti-HER2 que en combinación con la quimioterapia estándar reduce el riesgo de recaída y de muerte de las pacientes [18, 22].
- **Quimioterapia.** En el cáncer de mama, es habitual el uso de regímenes quimioterápicos que incluyen drogas que inducen daños en el DNA como las antraciclinas, la ciclofosfamida o el 5'fluor-uracilo, así como drogas dirigidas a microtúbulos entre las que tienen especial relevancia los taxanos como el paclitaxel o el docetaxel. Se ha demostrado que la combinación de taxanos con antraciclinas mejora los resultados de la terapia en términos de respuesta global [23]. Se recomienda el tratamiento con quimioterapia secuencial en lugar de poliquimioterapia debido a que la eficacia del tratamiento es similar independientemente de la forma de administración, pero la administración secuencial genera menor toxicidad en las pacientes [24].

3. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es uno de los tumores con mayor tasa de incidencia y de mortalidad en hombres de todo el mundo. Según las estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer que hacen referencia al año 2012, cada año se diagnostican 1,1 millón de nuevos casos en la población masculina mundial y unos 32000 nuevos casos en España [2, 25].

Desde que se generalizó el test de diagnóstico precoz de determinación de los niveles del antígeno prostático específico (PSA) en sangre, la incidencia del cáncer de próstata ha aumentado, pero al diagnosticarse los tumores en fase inicial, la supervivencia también ha aumentado en las últimas décadas y se espera que esta tendencia continúe. A pesar de ello, en España se producen unas 5400 muertes anuales por cáncer de próstata [2, 25].

3.1. Diagnóstico histopatológico del cáncer de próstata

Actualmente, la mayoría de los cánceres de próstata se detecta mediante la detección del PSA en sangre y/o el examen digital de recto (DRE). Por lo general, los cánceres de próstata en fase inicial son asintomáticos, mientras que los de estadios más avanzados se pueden detectar por los síntomas que causan. Si de acuerdo con las pruebas de detección y/o los síntomas se sospecha cáncer de próstata, el diagnóstico definitivo se realiza mediante una biopsia prostática [26].

3.1.1. Grado histológico

El grado de histológico del cáncer de próstata es determinado por el patólogo utilizando el sistema de puntuación de Gleason, basado en la medida en la que el tumor se asemeja histológicamente al tejido prostático normal. Consiste en la identificación de los dos patrones tumorales más prevalentes y en la asignación de una puntuación en escala del 1 al 5 a cada uno de ellos, los tumores cuyas células tienen una apariencia similar a las de las células normales reciben una puntuación baja, mientras que los tumores cuyas células se parecen menos a las células normales o tienen una apariencia más agresiva reciben una puntuación más alta [27]. Histológicamente el sistema de Gleason se representa en 5 patrones:

- **Patrón 1.** Las células tumorales se caracterizan por tener citoplasmas pálidos, núcleos regulares y pequeños con muy pocas mitosis que forman

glándulas bien diferenciadas, pequeñas y con morfología uniforme. La masa tumoral está bien circunscrita sin infiltrar hacia las glándulas benignas adyacentes ni hacia el estroma.

- **Patrón 2.** En esencia es similar al patrón 1, pero las glándulas presentan una ligera variación en tamaño y forma y no están tan bien circunscritas. En el interior de las glándulas, las células pueden estar apiladas en más de una capa y presentar un leve patrón cribiforme.
- **Patrón 3.** Las células tumorales forman glándulas de tamaño y morfología muy variable, tanto las glándulas como las células tumorales libres infiltran hacia el estroma y muestran un patrón cribiforme.
- **Patrón 4.** Las células tumorales son grandes, poligonales y poseen citoplasmas pálidos, muestran ciertas características de diferenciación glandular e infiltran de manera difusa hacia el estroma.
- **Patrón 5.** Las células tumorales presentan escasa o ninguna diferenciación glandular e infiltran de forma difusa hacia el estroma, es lo que se conoce como carcinoma indiferenciado.

La puntuación definitiva de Gleason es la suma de las puntuaciones asignadas a cada uno de los dos patrones tumorales más prevalentes. En base a esto, los tumores obtienen una calificación de entre 2 y 10 puntos y se clasifican en bien diferenciados o bajo grado si la calificación es de 2-6 puntos, moderadamente diferenciados si la calificación es de 7 y poco diferenciados o alto grado si la calificación es de más de 8 (Figura 4). Los tumores de bajo grado crecen más lentamente y tienen menos probabilidades de diseminarse que un cáncer de alto grado [28].

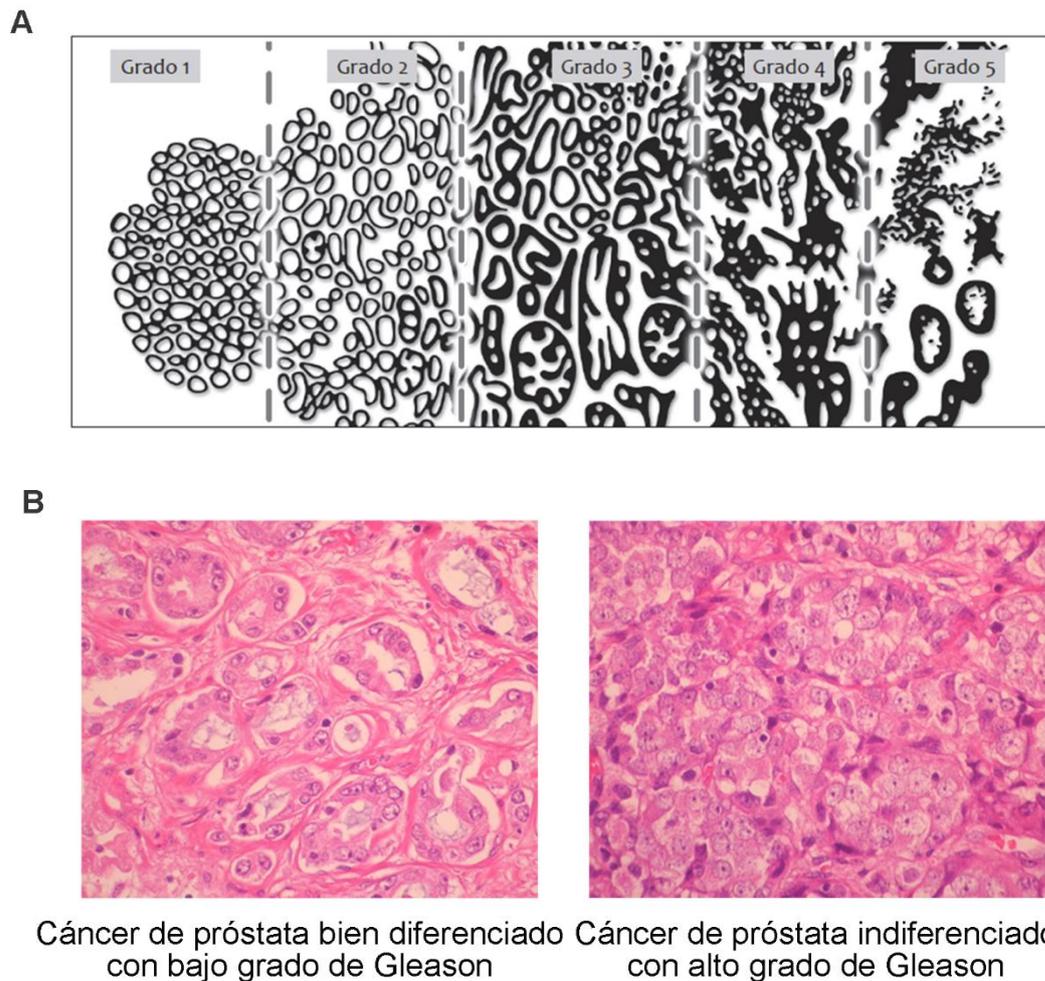


Figura 4. Sistema de puntuación de Gleason. (A) Representación de los 5 patrones histológicos establecidos por el sistema de Gleason. Adaptado de Gleason 1974 [27]. (B) La fotografía izquierda muestra un cáncer de próstata bien diferenciado con bajo grado de Gleason, mientras que la fotografía derecha muestra un cáncer de próstata pobremente diferenciado con alto grado de Gleason.

3.1.2. Grado histológico

Al igual que en el cáncer de mama, los patólogos utilizan el sistema TNM. Los resultados de la evaluación del tamaño, de la diseminación a ganglios linfáticos cercanos y de la existencia de metástasis a distancia se combinan además con el nivel de PSA en el momento del diagnóstico y con la puntuación de Gleason para determinar el estadio del cáncer de próstata en cada paciente. Se distinguen los siguientes estadios:

Estadio I o localizado.
El tumor se encuentra confinado exclusivamente a la próstata, sin afectación de ganglios linfáticos ni metástasis a distancia, una puntuación de Gleason inferior a 6 y niveles de PSA en sangre menores de 10 ng/ml. Incluye los siguientes supuestos: - Tumores no palpables ni visibles con estudios de imagen, diagnosticados durante una resección transuretral o mediante biopsia con aguja realizado por la presencia de altos niveles de PSA. - Tumores palpables y/o visibles con estudios de imagen que afectan sólo a la mitad de uno de los lóbulos prostáticos.
Estadio II. Dentro de este estadio se hacen dos subdivisiones:
Estadio IIA. Incluye los siguientes supuestos: - Tumores no palpables ni visibles con estudios de imagen, sin diseminación a ganglios linfáticos cercanos ni metástasis a distancia, con una puntuación de Gleason de 7 y con niveles de PSA inferiores a 20 ng/ml. - Tumores no palpables ni visibles con estudio de imagen, sin afectación de ganglios linfáticos regionales ni metástasis a distancia con una puntuación de Gleason de 6 o menor y niveles de PSA en sangre de 10-20 ng/ml. - Tumores palpables o visibles mediante estudios de imagen, que afectan a un único lóbulo prostático sin afectación de ganglios linfáticos adyacentes ni metástasis a distancia, con una puntuación de Gleason de 7 o menor y con niveles de PSA en sangre inferiores a 20 ng/ml.
Estadio IIB. Incluye los siguientes supuestos: - Tumores palpables o visibles con estudios de imagen que afectan a ambos lóbulos prostáticos sin diseminación a ganglios linfáticos adyacentes ni metástasis a distancia, con independencia de la puntuación de Gleason y de los niveles de PSA en sangre. - Tumores no palpables o visibles con estudios de imagen, sin afectación de ganglios linfáticos adyacentes ni metástasis a distancia, que con independencia de la puntuación de Gleason presentan niveles de PSA en sangre superiores a 20 ng/ml. - Tumores palpables o visibles con estudios de imagen, sin afectación de ganglios linfáticos cercanos ni metástasis a distancia y con una puntuación de Gleason de 8 o mayor, independientemente de los niveles de PSA en sangre.
Estadio III o localmente avanzado
Incluye tumores que, independientemente de su puntuación de Gleason o de sus niveles de PSA en sangre, crecen hacia fuera de la próstata, siendo posible la diseminación a las vesículas seminales, sin diseminación a ganglios linfáticos cercanos ni metástasis óseas.
Estadio IV o metastásico
Con independencia de la puntuación de Gleason y de los niveles de PSA en sangre, incluye los siguientes supuestos: - Tumores que se han diseminado hacia tejidos adyacentes a la próstata diferentes de las vesículas seminales, sin afectación de ganglios linfáticos ni metástasis a distancia. - Tumores con diseminación a ganglios y/o metástasis a distancia (vejiga, recto, hueso, hígado o pulmones).

Tabla 2. Estadaje del cáncer de próstata

3.2. Tratamiento del cáncer de próstata

El estadio del cáncer de próstata es uno de los factores más importantes para la elección de tratamiento, pero también se consideran otros factores como el riesgo de recurrencia tras el tratamiento inicial, la edad del paciente, su estado de salud o su expectativa de vida [29].

3.2.1. Terapia expectante y vigilancia activa

Los tumores de próstata en estadio I o II frecuentemente crecen de manera muy lenta y, sobre todo en pacientes de edad avanzada, es probable que nunca necesiten tratamiento por lo que se recomienda la vigilancia activa. Este método se basa en la supervisión del cáncer mediante pruebas de PSA en sangre, DRE, ecografía transrectal y biopsias prostáticas a intervalos regulares de tiempo para determinar si el cáncer está creciendo o está adquiriendo características más agresivas y aplicar otros tratamientos en caso de que sea necesario [30].

3.2.2. Cirugía

La cirugía es la opción más común para el tratamiento del cáncer de próstata localizado. El tipo principal de cirugía se conoce como prostatectomía radical y consiste en la extirpación de la glándula prostática y de una porción del tejido circundante, incluyendo las vesículas seminales. El objetivo principal de la prostatectomía es eliminar las células tumorales y, en la mayoría de las ocasiones, tiene un pronóstico excelente [31]. En caso de sospechar que el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos, se puede realizar la extirpación de los ganglios linfáticos y analizarlos durante o después de la intervención.

En los pacientes con cáncer de próstata avanzado se realiza otro tipo de cirugía denominada resección transuretral de la próstata que, aunque no tiene fines curativos, se lleva a cabo para aliviar los síntomas.

3.2.3. Radioterapia

La radioterapia utilizada puede ser externa o braquiterapia y se emplea como tratamiento inicial del cáncer de bajo grado confinado exclusivamente en la glándula prostática, con una tasa de curación similar a las de la prostatectomía radical [32]; como parte del tratamiento inicial junto con la terapia hormonal para tumores que se han diseminado hacia los tejidos adyacentes a la próstata; como terapia adyuvante tras la

cirugía en caso de que el tumor no se extirpara por completo o en caso de que el tumor regrese; y como terapia del cáncer avanzado para reducir el tamaño del tumor y para aliviar los síntomas.

3.2.4 Terapia hormonal o de privación de andrógenos

Los andrógenos, a través de la unión al receptor androgénico median el desarrollo normal de la próstata, Huggins y Hodges realizaron un estudio en el año 1941 en el que observaron que la retirada de andrógenos mediante castración quirúrgica o química provocaba la reducción del cáncer de próstata [33], sentando las bases de la ablación androgénica para el tratamiento de esta enfermedad, que aunque provoca una reducción del tamaño tumoral o un crecimiento más lento durante un tiempo, por sí sola no es curativa. Por ello, la terapia hormonal se emplea cuando el cáncer de próstata se ha propagado lejos de la próstata, cuando el cáncer regresa tras la cirugía y/o la radioterapia, junto con la radioterapia si el tumor presenta un fenotipo agresivo (alta puntuación de Gleason, altos niveles de PSA en sangre o diseminación fuera de la próstata) o antes de la radiación para reducir el tamaño tumoral. El andrógeno más abundante es la testosterona, se sintetiza en los testículos y es transformada en la próstata en 5-dihidrotestosterona (DHT), el metabolito activo. Otros andrógenos minoritarios son sintetizados en las glándulas adrenales y pueden transformarse también en testosterona. Cuando la DHT se une a su receptor, se induce la transcripción de genes regulados por promotores con elementos de respuesta a andrógenos [34].

La reducción de los niveles de andrógenos puede realizarse quirúrgicamente mediante orquitectomía o químicamente mediante el uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas que son medicamentos que reducen la cantidad de testosterona producida por los testículos. Por otro lado, el uso de antiandrógenos, esteroideos o no esteroideos, bloquea la unión de los andrógenos a sus receptores, impide su actividad transcripcional y bloquea el crecimiento de las células tumorales. Casi todos los pacientes con cáncer de próstata son sensibles a la terapia hormonal reduciéndose el crecimiento tumoral por disminución de la proliferación celular y la inducción de apoptosis, pero tras un periodo de tiempo variable que oscila entre meses y años, la terapia hormonal fracasa y la enfermedad avanza hacia cáncer de próstata resistente a castración que, a menudo, va acompañada de la aparición de la enfermedad metastásica [28],

asociada con la desregulación del ciclo celular y de los mecanismos apoptóticos normales [35-37].

3.2.5 Quimioterapia no hormonal

Este tipo de terapia se administra cuando el cáncer de próstata se ha propagado fuera de la glándula prostática y la terapia hormonal ya no es eficaz. En estadios iniciales de la enfermedad no es un tratamiento convencional, pero algunos estudios están determinando si este tratamiento podría ser útil si se administra tras la cirugía. Normalmente se trata de fármacos dirigidos a microtúbulos como los taxanos (docetaxel, cabazitaxel y paclitaxel), drogas que inducen daños en el DNA como las antraciclinas, y otros fármacos que destruyen las células tumorales. Por lo general, los fármacos se usan en monoterapia y en la mayoría de los casos, el primer medicamento que se administra suele ser el docetaxel con un efecto beneficioso sobre la supervivencia [38].

4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular por el que las células mueren de forma controlada en respuesta a diferentes estímulos y conduciendo a la eliminación de células potencialmente peligrosas, dañadas o infectadas [39]. Se trata de un proceso esencial para el desarrollo normal de los organismos y para el control de la homeostasis de los tejidos, por lo que su desregulación puede ser la causa de diversas patologías como enfermedades degenerativas, autoinmunidad o cáncer [40]. La importancia de la apoptosis en el tratamiento del cáncer de mama y de próstata resulta de las evidencias que demuestran que las drogas quimioterápicas o la radiación ionizante utilizadas en el tratamiento de ambas patologías pueden activar la ruta apoptótica en las células tumorales y que, la incapacidad de dichos quimioterápicos para inducir apoptosis en estas células se asocia con una peor respuesta terapéutica, con un peor pronóstico y con la progresión de la enfermedad.

Durante el proceso apoptótico, las células sufren una serie de cambios morfológicos como condensación de la cromatina y diversos orgánulos celulares, desintegración nucleolar y reducción del tamaño nuclear y celular, seguido de la fragmentación del núcleo y del citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana que reciben el nombre de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por

macrófagos. También se producen cambios bioquímicos como la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} encargadas de la fragmentación del DNA genómico en los espacios internucleosomales, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial o la exposición de fosfatidilserina en la hemimembrana externa, lo que las hace reconocibles para que puedan ser fagocitadas por los macrófagos [41] (Figura 5).

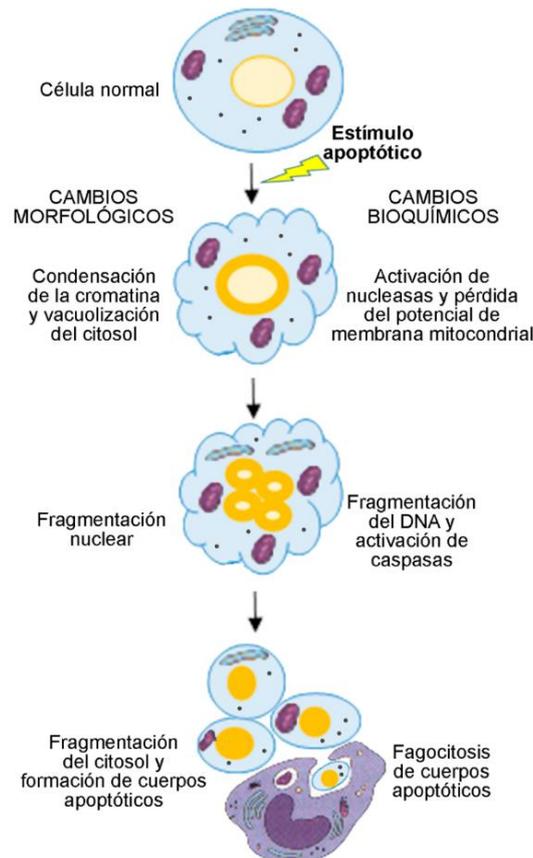


Figura 5. Cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis. El esquema muestra los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en una célula normal tras un estímulo apoptótico.

Se conocen dos vías de inducción de apoptosis, la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial, e independientemente de la vía que se active, las caspasas son las principales ejecutoras de la apoptosis. Las caspasas son un grupo de cisteína-proteasas sintetizadas como zimógenos que para activarse deben proteolizarse, evitando así una activación inadecuada. La acción de las caspasas, con frecuencia produce la inactivación de las proteínas diana, pero también pueden provocar la activación de las mismas si cortan un dominio regulador negativo o si inactivan una subunidad reguladora (Figura 6). Se han identificado 12 caspasas diferentes, de las cuales 8 parecen estar

implicadas en apoptosis [42] y dependiendo de la función que desempeñen se pueden clasificar en varios grupos:

- **Grupo I.** Se denominan caspasas inflamatorias ya que participan en la maduración de citoquinas, a este grupo pertenecen las caspasas -1, -4 y -5.
- **Grupo II.** Participan en la regulación de la apoptosis y, a su vez está formado por dos subgrupos:
 - o **Caspasas iniciadoras o apicales.** Son activadas en respuesta a señales de estrés, daño celular o señales de muerte, este grupo lo componen las caspasas -2, -8, -9 y -10.
 - o **Caspasas efectoras o ejecutoras.** Son activadas por las caspasas iniciadoras y son responsables de la proteólisis directa de diversos sustratos [40, 43], a este grupo pertenecen las caspasas -3, -6 y -7.

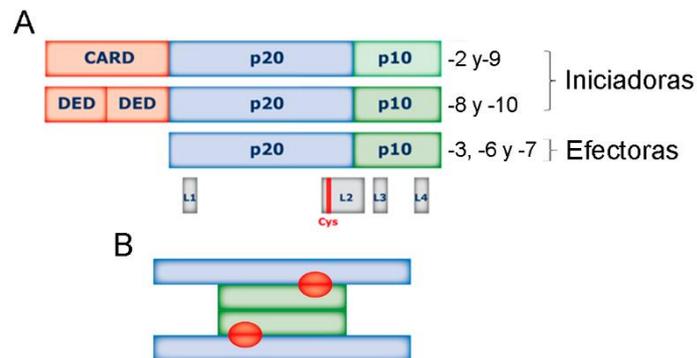


Figura 6. Estructura y activación de caspasas. (A) Las caspasas inactivas o procaspasas presentan un prodominio en el extremo amino terminal y un dominio catalítico formado por dos subunidades unidas covalentemente, la subunidad grande o p20 contiene el centro activo de la enzima y la subunidad pequeña o p10 en el extremo carboxilo terminal. Las caspasas iniciadoras tienen prodominios grandes CARD (dominios de reclutamiento y activación de caspasas) o dominios DED (dominios efectoras de muerte), mientras que las efectoras tienen prodominios pequeños (B) La forma activa de las caspasas es un tetradímero formado por dos subunidades p20 y dos subunidades p10, por lo que tienen dos centros activos. La dimerización de las caspasas iniciadoras está mediada por el prodominio, sin embargo la dimerización de las caspasas ejecutoras requiere la rotura de las uniones entre subunidades. Adaptado de Pop y Salvesen, 2009 [44].

4.1. Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte

La vía apoptótica extrínseca es activada tras la interacción de diferentes ligandos, la mayoría de ellos pertenecientes a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), con los denominados receptores de muerte que pertenecen a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y que se localizan en la membrana plasmática. Dichos receptores poseen dominios de muerte citoplásmicos (Dominios DD) que median la transmisión de la señal entre los receptores y la maquinaria apoptótica de la célula [45-47], de manera que cuando el ligando se une a su receptor, la señal de muerte se transmite mediante el complejo señalizador de inducción de muerte (DISC) produciéndose la activación de las caspasas -8 y -10 y propagándose la señal apoptótica al citosol [46-48] (Figura 7).

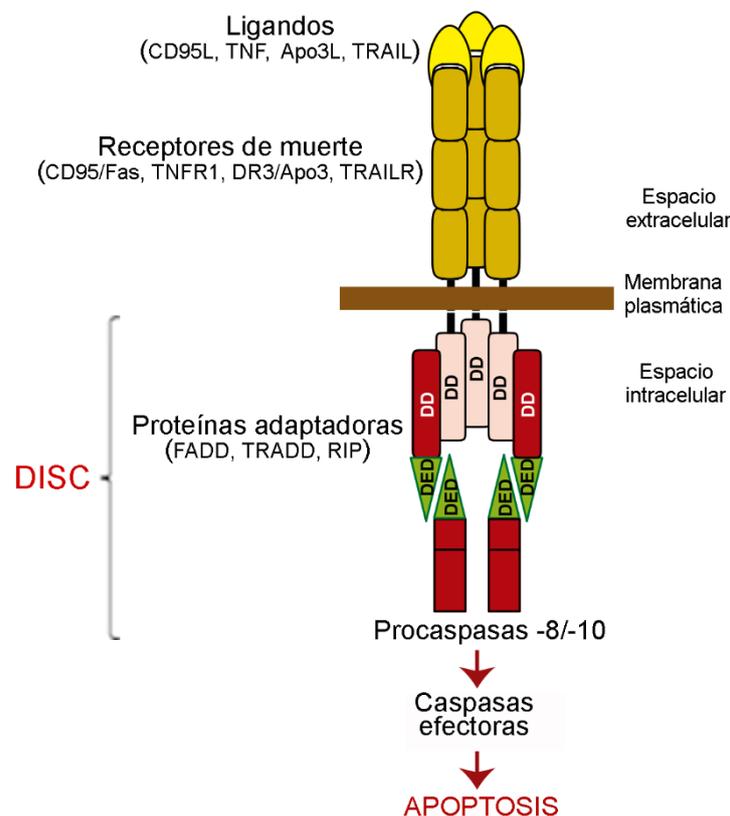


Figura 7. Esquema de la vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte. Esta vía se activa tras la unión de los receptores de muerte a sus ligandos, lo que implica la unión de los dominios de muerte de los receptores con los dominios de muerte de las proteínas adaptadoras. Como consecuencia, se produce el reclutamiento de las procaspasas -8 y -10 a través de sus dominios efectoros de muerte dando lugar a la formación del DISC o complejo señalizador de inducción de muerte. La activación

proteolítica de las procaspasas -8 y -10 provoca la activación de las caspasas efectoras y se produce la apoptosis. Adaptado de Ashkenazi y Dixit, 1998 [46].

4.2. Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial

La vía apoptótica intrínseca o mitocondrial se activa por diversos tipos de estrés como privación de factores de crecimiento o por diferentes daños intracelulares [49] y está controlada principalmente por la familia de proteínas Bcl-2. Uno de los puntos clave de esta vía es la liberación del citocromo *c* y otras proteínas reguladoras desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citoplasma, proceso regulado por proteínas de la familia Bcl-2. Cuando el citocromo *c* es liberado al citoplasma, éste se une a Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas) que tras sufrir un cambio conformacional recluta a la procaspasa-9 para formar un complejo denominado apoptosoma que promueve la activación de la caspasa-9, que a su vez activa a las caspasas ejecutoras -3 y -7, produciéndose la rotura de diversos sustratos [40, 50]. La rotura de la proteína PARP (poli-(ADP-ribosa)-polimerasa) por la caspasa-3 en las fases finales del proceso apoptótico se utiliza frecuentemente como marcador de apoptosis [44, 51] (Figura 9).

4.2.1. Familia de proteínas Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son las principales reguladoras de la vía apoptótica intrínseca y pueden suprimir o promover la apoptosis, ya que consta de miembros antiapoptóticos y proapoptóticos [52]. Los miembros de esta familia comparten al menos uno de los cuatro dominios de homología con Bcl-2 (dominios BH1-BH4), algunos de ellos poseen también un dominio transmembrana (dominios TM) que les permite anclarse en la membrana mitocondrial externa o en la membrana del retículo endoplásmico. En base a su función y a los dominios BH que presentan, las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en tres grupos (Figura 8).

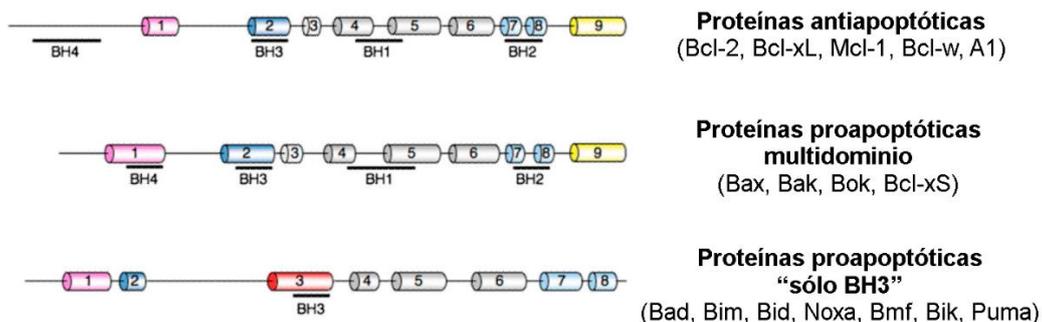


Figura 8. Estructura y clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2. Las proteínas de la familia Bcl-2 contienen dominios de homología con Bcl-2. En el esquema se representa la estructura de las proteínas antiapoptóticas, proteínas proapoptóticas multidominio y proteínas proapoptóticas “sólo BH3”, indicando la localización de los dominios BH1-4 en cada caso. Adaptado de Chipuk et al., 2010 [50].

- **Proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1).** Poseen 4 dominios BH y un dominio TM. La función de estas proteínas es proteger a las células de estímulos apoptóticos mediante la unión a proteínas proapoptóticas efectoras e inactivación de las mismas para preservar la integridad de la membrana mitocondrial externa.
- **Proteínas proapoptóticas multidominio o efectoras (Bax y Bak).** Poseen varios dominios BH y alguna también posee un dominio TM. Cuando estas proteínas se activan tras un estímulo apoptótico, forman homo-oligómeros que se integran en la membrana mitocondrial externa generando poros proteolipídicos que inducen su permeabilización y permiten la liberación de citocromo *c* al citosol.
- **Proteínas proapoptóticas “sólo BH3”.** Las proteínas de este grupo sólo poseen el dominio BH3 y en función de su capacidad para interactuar con proteínas antiapoptóticas y/o proapoptóticas efectoras se dividen en dos subgrupos:
 - **Sensibilizadoras o desrepressoras (Bad y Noxa).** Únicamente se unen a proteínas antiapoptóticas neutralizando la acción de estas últimas y permitiendo la liberación de las proteínas proapoptóticas efectoras.
 - **Activadoras directas (Bid y Bim).** Interaccionan con proteínas antiapoptóticas y con proteínas proapoptóticas efectoras, por lo que pueden inducir directamente la oligomerización de Bax y Bak y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa.

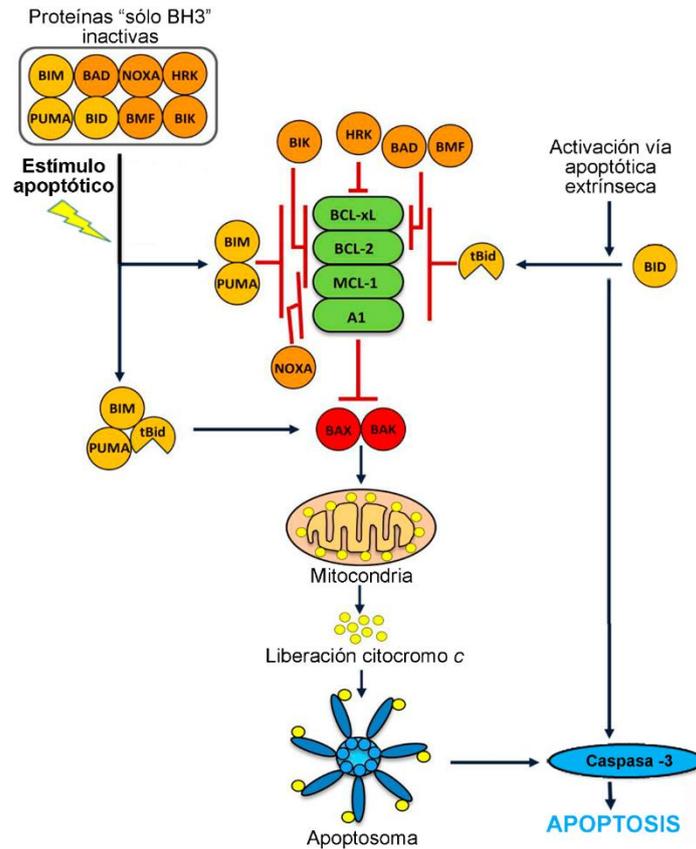


Figura 9. Esquema de la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial. La vía apoptótica intrínseca puede activarse por diferentes estímulos de muerte o a través de la activación de Bid mediada por la activación de la vía apoptótica extrínseca. Tras un estímulo apoptótico, las proteínas “sólo BH3” se activan inhibiendo a las proteínas antiapoptóticas y permitiendo la activación de las proapoptóticas efectoras o activando directamente a estas últimas. Como consecuencia, se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación al citosol del citocromo *c* que junto con Apaf-1 promueve la activación proteolítica de la caspasa-9. Tras la activación de la caspasa-9, se produce la activación de las caspasas efectoras y la apoptosis. Adaptado de Kollek et al., 2016 [48]

El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determinan la susceptibilidad de las células a la apoptosis de forma que cualquier alteración que afecte a este equilibrio como sobre-expresión de antiapoptóticas, infra-expresión de proapoptóticas o defectos en la señalización de la apoptosis pueden contribuir a la patogénesis y a la progresión del cáncer y se observan en numerosos tipos de cáncer humano. Además, dichas alteraciones pueden estar implicadas en la aparición de resistencia a quimioterápicos [52, 53]. Concretamente, en cáncer de mama se ha descrito que la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL induce resistencia a diferentes quimioterápicos, mientras que la disminución de los niveles de Bcl-2 aumenta la sensibilidad a diversos

quimioterápicos como la doxorubicina y los taxanos. Por otra parte, también se ha demostrado que la disminución de las proapoptóticas Bax o Bak suprime la apoptosis inducida por paclitaxel en células de cáncer de mama y su baja expresión en tejidos de pacientes con cáncer de mama se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad [54-60]. En líneas celulares de cáncer de próstata se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-xL induce resistencia a múltiples quimioterápicos [61-63]. También, hay estudios que muestran que los tumores de próstata con peor pronóstico, aquéllos con alto grado de Gleason o que son resistentes a castración, expresan altos niveles de Bcl-xL [64]. Otros estudios han demostrado que la sobre-expresión de Bax en líneas celulares de cáncer de próstata sensibiliza a la apoptosis inducida por diversos agentes quimioterápicos a los que eran resistentes [65]. Todos estos datos indican que el equilibrio entre miembros pro- y anti apoptóticos de la familia Bcl-2 determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis.

5. Microtúbulos como diana farmacológica

5.1. Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras proteicas que forman parte esencial del citoesqueleto celular y juegan un papel crucial en la organización interna de todas las células eucariotas. Su componente principal es una proteína globular de 100 kDa llamada tubulina; comúnmente se denomina tubulina a un heterodímero formado por dos isoformas homólogas, α y β , que comparten aproximadamente el 40% de identidad de secuencia y poseen estructuras tridimensionales similares [66, 67]. Los dímeros de tubulina interactúan entre sí para formar protofilamentos rectos que posteriormente se asocian de forma paralela y con cierto desplazamiento, estableciendo contactos laterales entre ellos para formar los microtúbulos, unas estructuras de 25 nm de diámetro y longitud variable [68, 69].

Debido a que cada protofilamento está delimitado por α -tubulina en un extremo y por β -tubulina en otro, los microtúbulos son estructuras polarizadas y se denomina extremo negativo al extremo delimitado por α -tubulina y extremo positivo al delimitado por β -tubulina [70]. Los heterodímeros de tubulina se añaden con menor afinidad a la α -tubulina que a la β -tubulina, por lo que el extremo positivo de los microtúbulos es, preferentemente, el extremo de crecimiento del microtúbulo y en él predomina la

polimerización frente a la despolimerización, mientras que en el extremo negativo predomina la despolimerización (Figura 10).

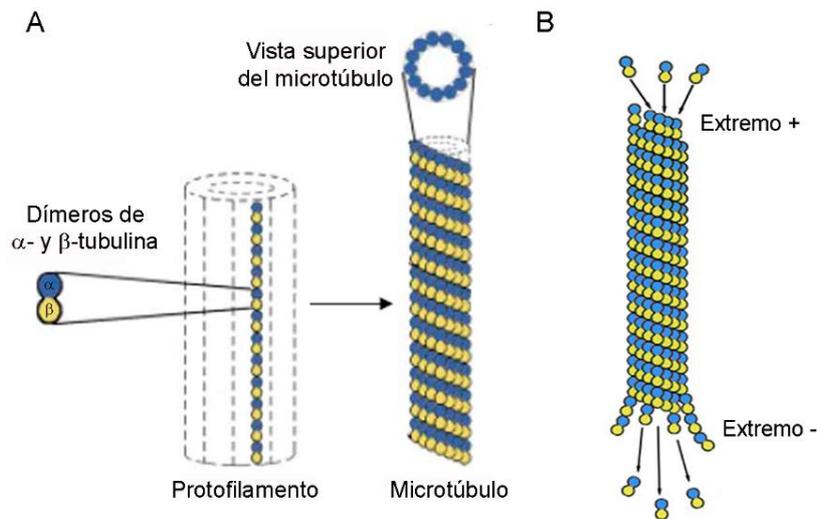


Figura 10. Estructura de los microtúbulos. (A) Las subunidades de α -tubulina y β -tubulina forman heterodímeros que interaccionan linealmente para formar el protofilamento. Los protofilamentos se asocian lateralmente dando lugar a la pared cilíndrica del microtúbulo. (B) El esquema muestra el extremo positivo del microtúbulo o extremo de polimerización, y el extremo negativo del microtúbulo o extremo de despolimerización, delimitados por β -tubulina y α -tubulina respectivamente. Adaptado de Stanton et al., 2011 [71].

Una vez que comienza la formación de un microtúbulo, la incorporación de nuevos dímeros de tubulina hace que crezcan en longitud, pero este proceso puede detenerse e incluso revertir de forma que el microtúbulo comience a despolimerizarse [72, 73]; esta alternancia entre polimerización y despolimerización se denomina inestabilidad dinámica y es un fenómeno dependiente del aporte continuo de energía procedente de la hidrólisis de GTP [70, 74-76] (Figura 11).

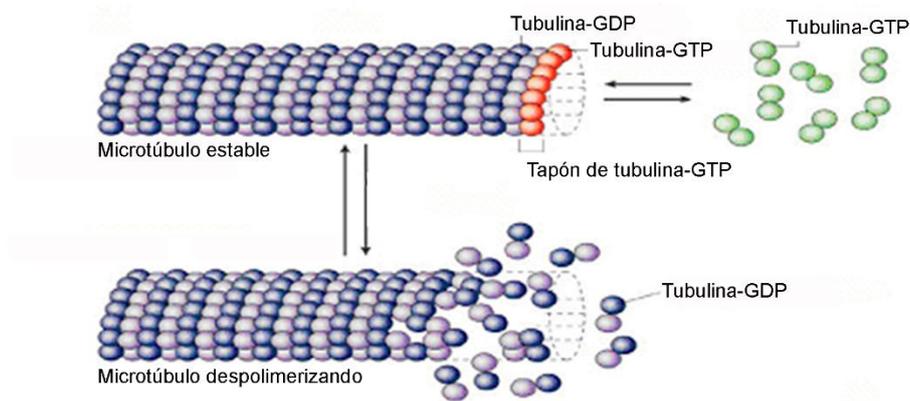


Figura 11. Dinámica de los microtúbulos, modelo del tapón de tubulina-GTP. La adición de nuevos dímeros de tubulina al microtúbulo, requiere que las subunidades de α -tubulina y β -tubulina estén unidas a GTP y que la molécula de GTP de la β -tubulina se hidrolice a GDP liberándose un fosfato inorgánico. Esta hidrólisis de GTP se realiza tras un lapso de tiempo, por lo que si la adición de dímeros es rápida, el extremo positivo del microtúbulo estará delimitado por un tapón de tubulina-GTP y se favorecerá la elongación del microtúbulo, mientras que si la adición de dímeros es lenta, la molécula de GTP es hidrolizada y en el extremo positivo del microtúbulo estará delimitado por tubulina-GDP y se favorecerá la despolimerización. Adaptado de Jordan y Wilson, 2004 [77].

Las propiedades dinámicas de los microtúbulos son esenciales para el desempeño de algunas de sus funciones como son el mantenimiento de la forma celular, el transporte intracelular o la formación del huso mitótico [78, 79]. Durante la formación del huso mitótico, los extremos negativos de los microtúbulos se concentran en los polos del huso, en torno a los centrosomas, y los extremos positivos se dirigen hacia el ecuador, lugar en el que los cromosomas deben alinearse correctamente para formar la placa metafásica antes de separarse y dar lugar a las dos células hijas. Una alteración en la dinámica de los microtúbulos afecta a todas estas funciones, entre ellas a la formación del huso mitótico y a la progresión normal del ciclo celular [80].

El papel crítico de los microtúbulos durante la división celular junto con la elevada tasa de crecimiento de las células tumorales hacen de la tubulina una diana muy importante para el desarrollo de quimioterápicos. Por ello, desde que la tubulina se identificara como la proteína de unión a la colchicina, un veneno natural con efectos sobre el ciclo celular y, en particular, sobre la formación del huso mitótico [81, 82], el interés por esta proteína como diana antitumoral ha ido en aumento [83].

5.2. Drogas dirigidas a microtúbulos

Este grupo de compuestos ejercen su acción interaccionando con la tubulina e inhibiendo la dinámica de los microtúbulos, lo que impide la formación del huso mitótico y el alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica, con el consiguiente bloqueo de la mitosis en la transición metafase-anafase y, como consecuencia, inhibiendo la proliferación celular. Debido a esto, los fármacos dirigidos a microtúbulos a menudo se denominan antimitóticos. En la actualidad se conocen multitud de compuestos de este tipo y muchos de ellos se usan satisfactoriamente en el tratamiento de diversos tipos de cáncer o están siendo objeto de ensayos clínicos [84, 85].

Las drogas dirigidas a microtúbulos se han clasificado convencionalmente en dos grandes grupos en base a los efectos que producen sobre la masa total de los microtúbulos cuando son administrados a altas concentraciones [83, 86]. Podemos distinguir:

- **Desestabilizadores de microtúbulos (alcaloides de la Vinca, colchicina, PEITC).** Inhiben la polimerización de los microtúbulos desestabilizándolos y provocando una disminución de la masa total del polímero [87, 88].
- **Estabilizadores de microtúbulos (taxanos, epotilonas, discodermolide).** Promueven la polimerización de los microtúbulos estabilizándolos y provocando un aumento de la masa total de los mismos [89].

Más recientemente, se considera que los efectos que ejercen estos compuestos sobre la dinámica de microtúbulos tienen más importancia que los efectos que producen sobre la masa total de los mismos, siendo esta circunstancia la que representa el mecanismo de acción que ocurre de forma más común en la clínica [90-92].

5.2.1. Paclitaxel

El paclitaxel pertenece al grupo de los taxanos y fue el primer compuesto estabilizador de microtúbulos descubierto, se aisló de la corteza del *Taxus brevifolia* en 1971 [93, 94].

Actualmente, tanto el paclitaxel como su análogo semisintético el docetaxel, se utilizan con éxito en el tratamiento de gran cantidad de tumores sólidos como mama, ovario, pulmón, próstata o sarcoma de Kaposi [77, 95-97]. A pesar de ello, desventajas como su baja solubilidad acuosa, sus efectos secundarios (neurotoxicidad) o el desarrollo de resistencias de las células tumorales, limitan su aplicabilidad [98].

5.2.2. Feniletil-isotiocianato (PEITC)

El PEITC es un derivado de plantas crucíferas perteneciente al grupo de los isotiocianatos. Es uno de los isotiocianatos más extensamente estudiados y se ha demostrado que posee actividad quimiopreventiva y quimioterápica frente a varios tipos tumorales [99, 100].

Numerosos estudios preclínicos demuestran la eficacia antitumoral del PEITC y apoyan su uso clínico para el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre ellos próstata, pulmón y mama [101-104]. También se ha demostrado su eficacia en combinación con otros agentes quimioterápicos convencionales como docetaxel en cáncer de próstata [105], vimblastina en cáncer de mama [106] o cisplatino en cáncer de cuello uterino y mama [107]. Todo ello indica que el PEITC puede potenciar los efectos de los agentes quimioterápicos clásicos y, que el uso de terapias combinadas podría ser beneficioso para el tratamiento del cáncer resistente a alguno de estos quimioterápicos. Aunque estos datos justifican el uso del PEITC en pacientes, se requieren más evidencias para su aplicación clínica en el tratamiento del cáncer y, con este objetivo, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos en fase I y II en cáncer de pulmón y cáncer oral, en los que el PEITC es el protagonista y cuyos resultados se publicarán en un futuro próximo [99, 100, 108].

5.3. Drogas dirigidas a microtúbulos y bloqueo del ciclo celular en mitosis

El ciclo celular consta de dos periodos:

- **Interfase.** Es el periodo de mayor duración del ciclo celular y en él, la célula aumenta de tamaño y duplica su material genético. Se divide en tres fases:
 - **Fase G1.** La célula duplica su tamaño y sintetiza diferentes orgánulos y proteínas.
 - **Fase S.** Es la fase de síntesis del DNA y al final de la misma hay dos copias exactas de cada cromosoma.
 - **Fase G2.** Durante esta fase la célula se prepara para la división celular.
- **Mitosis.** Es un proceso de división celular asociado a la generación de dos células hijas exactamente iguales a la célula de origen. Se divide en 4 fases:
 - **Profase.** Esta fase se caracteriza por la condensación de la cromatina para la generación de los cromosomas y por la ruptura de la membrana nuclear. Durante profase, los cromosomas están formados por dos cromátidas hermanas que se mantienen unidas a través de una estructura proteica llamada centrómero.
 - **Metafase.** Los centrosomas se duplican y migran hacia polos opuestos de la célula, desde donde actúan como centros organizadores de microtúbulos para la formación del huso

mitótico. Además, los cromosomas se alinean en el centro de la célula y se unen a los microtúbulos del huso mitótico formando la placa metafásica.

- **Anafase.** Las cromátidas hermanas se separan y se dirigen a polos opuestos de la célula.
- **Telofase.** Cada juego de cromátidas hermanas es rodeado por una membrana nuclear, lo que dará lugar a los núcleos de las células hijas tras la citocinesis.

Durante la mitosis, el punto de control del huso mitótico (SAC) es el responsable de la generación de una señal inhibitoria de anafase y retrasando la segregación de los cromosomas hasta que todas las cromátidas hermanas estén unidas y perfectamente orientadas en el huso mitótico formando la placa metafásica. Entre otros componentes del SAC, encontramos a la proteína BubR1 que se une a Cdc20 regulando negativamente la actividad del complejo promotor de anafase/ciclosoma (APC/C) e impidiendo la poliubiquitinación de dos sustratos claves de esta ubiquitina ligasa como son ciclina B1 y Pttg1, previniendo su degradación por el proteasoma 26S y retrasando el inicio de anafase [109-111]. Ante una mitosis normal, el punto de control del huso se satisface favorablemente y el APC/C ubiquitina a la ciclina B1 y al Pttg1 provocando su rápida degradación por el proteasoma, lo que conduce a la salida de mitosis y a la división celular [112, 113] (Figura 12).

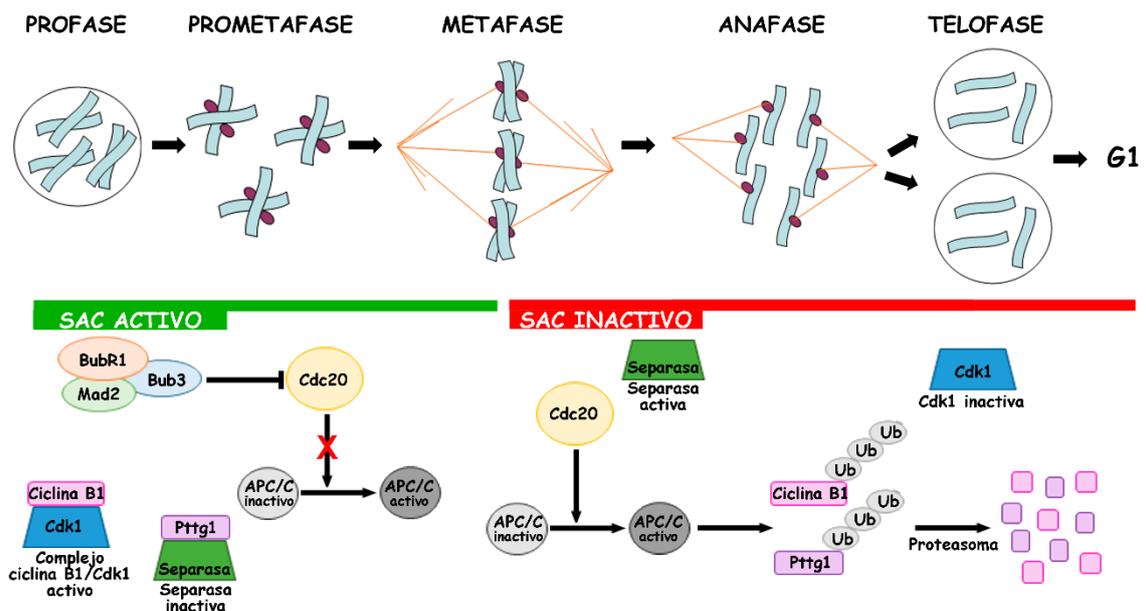


Figura 12. Estado de activación y función del SAC durante el ciclo celular. El SAC, representado por varios de sus componentes como BubR1, Mad2 o Bub3, se mantiene activo hasta que los cinetocoros de los cromosomas están unidos a los microtúbulos del huso mitótico y las cromátidas hermanas están perfectamente biorientadas, con el objetivo de asegurar la correcta segregación de las cromátidas hermanas durante la división celular. La inactivación del SAC implica la liberación de Cdc20 y la consecuente activación del APC/C, esto conduce a la ubiquitinación de sus sustratos de anafase ciclina B1 y Pttg1 y, a la posterior degradación proteolítica de los mismos por el proteasoma. La degradación de ciclina B1 y Pttg1 provoca la inactivación de Cdk1 y la activación de la separasa respectivamente y, como consecuencia, las cromátidas hermanas se separan. Tras esto se produce la citocinesis y la célula sale de mitosis. El uso de drogas dirigidas a microtúbulos, impide la correcta formación del huso y esto induce una activación crónica del SAC evitando la degradación proteolítica de ciclina B1 y Pttg1 lo que retrasa el inicio de anafase. Adaptado de Musacchio y Salmon, 2007 [110].

Las drogas dirigidas a microtúbulos como el paclitaxel, impiden la correcta formación del huso mitótico provocando una activación crónica del SAC y un arresto prolongado en mitosis [114, 115]. En ocasiones, a pesar de la activación mantenida del SAC por la exposición a drogas dirigidas a microtúbulos, la ciclina B1 es capaz de degradarse [115, 116]. Si los niveles de ciclina B1 caen por debajo del umbral requerido para mantener el bloqueo en mitosis, la célula escapará de esta fase del ciclo celular; este proceso por el que la célula escapa del arresto en mitosis incluso en condiciones que mantienen el SAC activo, como es el tratamiento con paclitaxel, se denomina deslizamiento mitótico.

Tras una parada prolongada en mitosis inducida por la activación del SAC, se han descrito varios destinos posibles para las células. Algunas mueren durante la parada en mitosis, mientras que otras escapan del bloqueo en mitosis mediante deslizamiento en un estado G1 tetraploide, tras el cual las células mueren, quedan bloqueadas en G1 o inician una nueva ronda de ciclo celular [110, 112, 115, 117, 118] (Figura 13). Estas diferentes posibilidades indican que el bloqueo de la división celular previene la proliferación celular, pero no necesariamente mata a las células. La relación entre el bloqueo en mitosis inducido por las drogas antimitóticas y la supervivencia o muerte de las células no se conoce totalmente, aunque se ha propuesto un modelo en el que dos redes compiten entre sí durante la parada en mitosis, una de ellas induce las rutas de muerte y la otra controla la degradación de ciclina B1 y la salida de mitosis. Ambas redes tienen umbrales, de modo que si lo primero que ocurre es que los niveles de ciclina B1 caen por debajo del umbral, la célula saldrá de mitosis por deslizamiento; mientras que si el umbral

de muerte es el que se alcanza en primer lugar, la célula morirá durante la parada en mitosis [118].

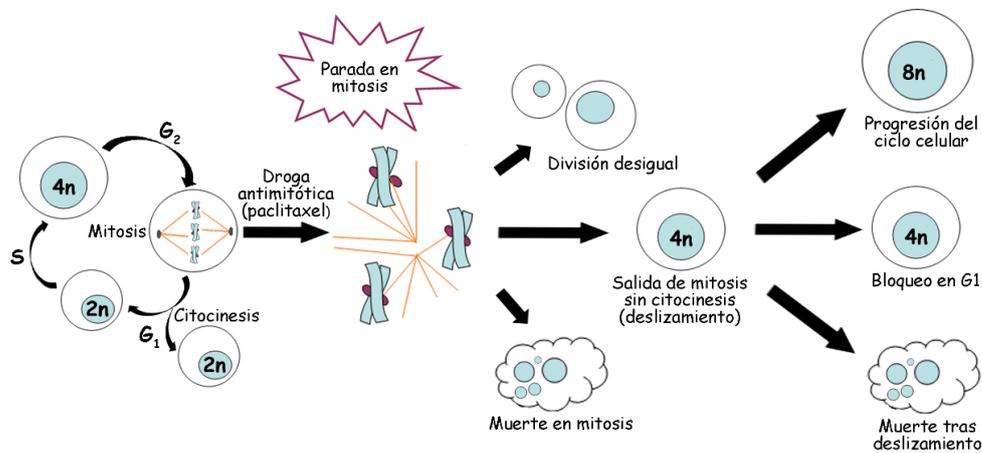


Figura 13. Destinos posibles de las células tratadas con drogas dirigidas a microtúbulos. La exposición a antimitóticos, provoca la activación crónica del SAC y, por tanto, el bloqueo del ciclo celular en mitosis. Tras el bloqueo en mitosis, las células pueden morir durante la mitosis, dividirse asimétricamente generando células hijas aneuploides o salir de la mitosis sin citocinesis mediante deslizamiento. Así mismo, tras el deslizamiento las células pueden morir, quedar bloqueadas en G1 durante un tiempo indefinido o continuar con una nueva ronda de ciclo celular. Adaptado de Gascoigne y Taylor, 2009 [118].

6. Proteína quinasa C delta (PKC δ)

La familia PKC son un conjunto de serina/treonina quinasas que consta al menos de 10 isoformas codificadas por 9 genes diferentes en mamíferos. Habitualmente, los miembros de esta familia se dividen en tres grandes grupos atendiendo a su estructura primaria y al requerimiento de distintos cofactores para la regulación de su actividad enzimática [119]:

- **PKCs clásicas (PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ).** Poseen dos copias del dominio C1 y un dominio C2 en su región reguladora, para su activación requieren diacilglicerol o ésteres de forbol, fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina o fosfatidilinositol-bifosfato e inones Ca²⁺ [120].
- **PKCs nuevas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ).** Estructuralmente son similares a las PKCs clásicas, poseen dos dominios C1 y un dominio C2,

pero este último se localiza en el extremo amino terminal. Las PKCs pertenecientes a este grupo no requieren iones Ca^{2+} para su activación, son dependientes de diacilglicerol o de ésteres de forbol [121].

- **PKCs atípicas (PKC ζ y PKC ι/λ).** Carecen de dominio C2 y en su estructura aparece un dominio C1 atípico y un dominio PB1 de interacción con otras proteínas como PAR6. Su activación no es dependiente de iones Ca^{2+} , de diacilglicerol ni de ésteres de forbol [122].

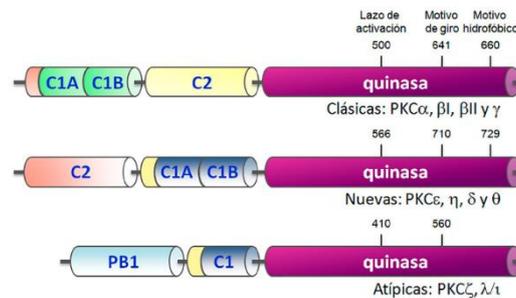


Figura 14. Estructura primaria de las isoenzimas de la familia PKC. Se representan de manera esquemática tanto los dominios característicos de cada grupo de PKCs, así como la posición que ocupan. En el extremo amino terminal se encuentra la región reguladora con el dominio pseudosustrato, y los dominios C1 y C2 que unen diferentes cofactores dependiendo de la isoforma. En el extremo carboxilo terminal, se localiza la región catalítica de la enzima con el dominio quinasa de unión al ATP y al sustrato. Los dominios catalíticos poseen también un lazo de activación, un motivo de giro y, a excepción de las PKCs atípicas, un motivo hidrofóbico. Adaptado de Newton, 2010 [121].

Las PKCs están implicadas en la transducción de un amplio rango de señales extracelulares que inducen la generación de un segundo mensajero lipídico, por lo que regulan gran variedad de funciones celulares como supervivencia, crecimiento, proliferación, migración, transformación maligna o apoptosis [123-125]. Alteraciones en la regulación de las proteínas de esta familia pueden provocar diversas fisiopatologías como cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes, enfermedades del sistema nervioso y diversas patologías cardiacas, pulmonares o renales [126]. Aunque el mecanismo molecular que conduce al estado patológico no está totalmente caracterizado, la mayoría de estudios apuntan a alteración en la localización subcelular, de los niveles de expresión y del estado de activación de las diferentes isoformas.

La primera evidencia que introdujo a las PKCs en la investigación oncológica fue su identificación como los receptores intracelulares de los ésteres de forbol, unos compuestos naturales derivados de plantas que poseen capacidad promotora de tumores

[127]. Actualmente existen numerosas evidencias que implican a la familia de las PKCs, de un modo incuestionable, en la generación de tumores y en la metástasis. Cada isoenzima se asocia de manera específica al desarrollo de determinados tipos de cáncer y a su evolución. La vinculación de las PKCs con la carcinogénesis, las convierte en dianas clave para el desarrollo de nuevas estrategias o terapias antitumorales. Está generalmente extendido que la activación de las PKCs contribuye al cáncer, pero en el caso de la PKC δ , más que su activación, es su inactivación la que se ha asociado con progresión tumoral [128, 129], mientras que hay algunos estudios que apuntan a un papel antiapoptótico y pro-supervivencia de la isoforma PKC δ , la mayoría de estudios indican que PKC δ promueve supresión de la proliferación e inducción de apoptosis [130]. La isoforma PKC δ se activa por numerosos estímulos apoptóticos inducidos por genotoxinas, estrés oxidativo y receptores de muerte [129, 131] y su inhibición bloquea la apoptosis inducida por gran variedad de estímulos en muchos tipos celulares [132, 133]. Entre los fenómenos apoptóticos inducidos por la activación de PKC δ encontramos el incremento de citocromo *c*, la secreción de factores de muerte celular, la activación de la ruta de JNK y p38, de las caspasas -3 y -8, de STAT1, de p53 y de laminina B [133, 134]. También interviene en la inhibición de las ciclinas A, D y E y en la hipofosforilación de la proteína de retinoblastoma [135, 136]. Además, la expresión de PKC δ está disminuida en cáncer de vejiga, cerebro y carcinomas de células escamosas, sugiriendo todo ello que esta isoforma posee una función supresora de tumores.

Concretamente, en el cáncer de próstata, hay estudios que vinculan a PKC δ con proliferación [137], angiogénesis [138] o migración e invasión [139-141], pero la mayoría de artículos indican que la expresión de PKC δ se requiere para la inducción de apoptosis por drogas antitumorales o a través de receptores de muerte [142-148]. En un artículo previo del laboratorio, documentamos que el silenciamiento de PKC δ disminuía la apoptosis inducida por el tratamiento con PEITC y anti-FAS o con paclitaxel en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP, y que la sobreexpresión de PKC δ incrementaba la apoptosis inducida por dichos tratamientos en la línea celular de cáncer de próstata PC3. Además, observamos la pérdida de expresión de PKC δ en pacientes con cáncer de próstata pobremente diferenciados con alto grado de Gleason, y esto podría estar relacionado con resistencia a apoptosis, progresión tumoral y un pronóstico desfavorable [102].

Objetivos

En la actualidad, los taxanos se incluyen en los regímenes quimioterápicos de elección más comunes para el tratamiento de tumores sólidos y, aunque han supuesto un gran avance en el tratamiento de la enfermedad metastásica del cáncer de mama y próstata, sus efectos secundarios y la adquisición de resistencia hacen necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Por ello, los objetivos del estudio son:

1. Estudiar la respuesta apoptótica inducida por taxanos y otras drogas dirigidas a microtúbulos en líneas celulares de cáncer de mama y próstata.
2. Estudiar los efectos inducidos por los taxanos y otras drogas dirigidas a microtúbulos sobre el ciclo celular en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama y próstata para determinar si la inducción de apoptosis es o no dependiente del bloqueo de las células en mitosis.
3. Estudiar el comportamiento de las proteínas de la familia Bcl-2 en respuesta al tratamiento con taxanos y otros antimetabólicos en las líneas celulares previamente mencionadas y determinar la relevancia de esta familia de proteínas en la sensibilidad a dichas drogas.
4. Estudiar la influencia de PKC δ en la apoptosis inducida por taxanos en líneas celulares de cáncer de próstata.
5. Analizar los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2, PKC δ y otras proteínas de interés en biopsias de pacientes con cáncer de mama o próstata, así como como su correlación con parámetros clínicos o con respuesta al tratamiento con taxanos.
6. Búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas mediante la combinación de taxanos con otros antimetabólicos u otros fármacos, con el objetivo de sensibilizar a las líneas celulares de cáncer de mama y próstata resistentes a taxanos.

Material y métodos

1. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y T-47D y las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y LNCaP, se obtuvieron de la colección de células de la “Interlab Cell Line Collection” (Génova, Italia). Todas ellas se cultivaron de manera rutinaria en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Biochrome, Millipore), glutamina 2 mM (Gibco), tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazine-etanosulfónico) 10 mM (Gibco), penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml (Sigma), en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos fueron diluidos de forma periódica mediante tripsinización para mantenerlos siempre a subconfluencia.

1.1. Tripsinización

Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma) y posteriormente se añadió una solución de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.05% (Lonza) y se incubaron a 37°C. El tiempo de incubación fue diferente para cada línea celular, en todos los casos se incubó el tiempo mínimo necesario para despegar cada una de las líneas celulares. Una vez despegadas, la tripsina se neutralizó mediante la adición de medio suplementado, el volumen de medio suplementado añadido fue 4 veces el volumen de tripsina. Tras esto, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1800 rpm, se resuspendieron en medio suplementado y se sembraron de nuevo. Este mismo procedimiento se usó para recoger los experimentos realizados con dichas líneas celulares.

1.2. Congelación de células

Los cultivos celulares subconfluentes se alimentaron entre 4 y 6 horas antes de la congelación, se tripsinizaron, se resuspendieron en medio de congelación y se pusieron aproximadamente 5×10^6 células/criotubo. La suspensión de células en medio de congelación se enfrió a 4°C durante una hora, se congelaron a -80°C durante 24-48 horas y posteriormente se guardaron en nitrógeno líquido indefinidamente.

1.3. Descongelación de células

Las células se descongelaron transfiriendo los criotubos del nitrógeno líquido a un baño a 37°C, agitando el criotubo en el agua hasta su completa descongelación. Las

células se resuspendieron en medio suplementado, se sembraron en un frasco de cultivo y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

2. Ensayos de inducción de apoptosis

Las soluciones de paclitaxel (Calbiochem), PEITC (Sigma), LY294002 (Calbiochem) y XAV939 (Selleck Chemicals) se prepararon a 10 mM en dimetil-sulfóxido (DMSO) (Calbiochem), se alicuotaron y se conservaron a -20°C. Las células se sembraron a subconfluencia y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión y a continuación se añadió DMSO a las células no tratadas, usadas como control, y las diferentes drogas o combinaciones de drogas indicadas en cada caso. Las concentraciones de paclitaxel utilizadas en las líneas celulares de cáncer de mama y próstata fueron 1 y 2.5 µM respectivamente, la concentración de PEITC utilizada en las líneas celulares de cáncer de mama fue 10 µM, la concentración de LY294002 utilizada en las líneas celulares de cáncer de próstata fue 0.5 µM y la concentración de XAV939 utilizada en las líneas celulares de cáncer de próstata fue 1 µM. En las líneas celulares de cáncer de mama, los tratamientos secuenciales se realizaron añadiendo la primera droga durante 24 horas y después, añadiendo la segunda droga durante 24 o 48 horas. En el caso de las líneas celulares de cáncer de próstata, los tratamientos secuenciales se realizaron añadiendo la primera droga durante 8 horas y después, añadiendo la segunda droga durante 40 horas. La inducción de apoptosis se midió mediante la activación de caspasas y el clivado de la PARP por Western blot y mediante la cuantificación de cuerpos apoptóticos en los diferentes tratamientos.

2.1. Cálculo del porcentaje de PARP clivada

El porcentaje de clivado de PARP se calculó como el valor densitométrico de la banda de PARP clivada (85 kDa) dividida por el valor densitométrico de las bandas de PARP intacta y clivada (116 y 85 kDa) y multiplicada por 100.

2.2. Tinción y cuantificación de cuerpos apoptóticos

Las células sometidas a los diferentes tratamientos se imprimaron en portaobjetos silanizados, se fijaron en una solución de metanol:ácido acético glacial (3:1) (Fisher Chemicals y Merck) durante 10 minutos a -20°C y se dejaron secar al aire. Posteriormente se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vysis) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados y con una cámara digital

(Leica). Al menos se examinó la morfología nuclear de 100 células y se calculó el porcentaje de cuerpos apoptóticos para cada condición.

3. Ensayos de silenciamiento génico

Los ensayos de silenciamiento génico se realizaron con RNAs de interferencia pequeños (siRNAs) y el reactivo DharmaFECT 2 (GE Dharmacon) siguiendo las instrucciones del fabricante. El siRNA control negativo y el siRNA específico para PKC δ utilizados en los experimentos fueron pools validados de GE Dharmacon (ON-TARGET plus Non-targeting pool D-001810 y ON-TARGET plus Human PRKCD siRNA-SMART pool L-003524). Todos los siRNAs se usaron a una concentración de 50 nmol/L. Las células se sometieron a diferentes tratamientos 24 horas después del silenciamiento.

4. Ensayos clonogénicos

Las células se sembraron en pocillos de 2 cm², tras 24 horas de incubación se transfectaron con siRNA control o con siRNA PKC δ y 24 horas después fueron sometidas a diferentes tratamientos, tras los cuales, el medio que contenía las diferentes drogas o combinaciones de drogas se eliminó y se substituyó por medio RPMI suplementado y las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Transcurridos 14 días desde el final del tratamiento, se descartó el medio y tras un lavado con PBS las células se fijaron y se tiñeron siguiendo el método panóptico rápido (QCA), un método de tinción celular diferencial que se lleva a cabo en tres pasos y que implica el uso de tres soluciones:

- **Solución panóptico n° 1.** Se trata de una solución alcohólica de triarilmetano que fija las células evitando el deterioro de las mismas.
- **Solución panóptico n° 2.** Se trata de una solución tamponada de xanteno que proporciona una tinción rosa pálido del citosol y de las granulaciones acidófilas.
- **Solución panóptico n° 3.** Se trata de una solución tamponada de tiazina que proporciona una tinción de color azul-violeta de los núcleos y las granulaciones basófilas. Tras la adición de esta última solución, se lavó con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorantes y se dejó secar.

Finalmente, las células se visualizaron en un microscopio invertido equipado con una cámara digital y se contabilizó el número de colonias formadas en cada una de las condiciones, considerándose como colonias aquellos clones de más de 50 células.

5. Western blot

Las células sometidas a los diferentes tratamientos se tripsinizaron, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular se lavó en 1 ml de PBS. Nuevamente las células se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se lisaron con homogeneizadores de plástico (Eppendorf) en tampón de lisis NonidetP-40 (NP-40) con inhibidores de proteasas (Sigma) y fosfatasas (Roche). Los lisados se incubaron durante una hora a 4°C y se centrifugaron 30 minutos a 12000 rpm y a 4°C. La concentración de proteínas de los lisados se cuantificó mediante ensayo colorimétrico usando el método BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas se desnaturalizaron añadiendo tampón de carga de Laemmli 1× y calentando a 98°C durante 2 minutos en un termobloque. Generalmente, 10 µg de proteínas de cada lisado se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) utilizando como electrolito tampón Tris-glicina 1×. Las proteínas del gel se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond-ECL, GE Healthcare) aplicando un voltaje constante de 100 V durante 90-120 minutos, en tampón de transferencia. Las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con una solución de Ponceau S 1× para comprobar que las cantidades de proteínas de las diferentes condiciones eran comparables.

Para la inmunodetección, los sitios de unión inespecíficos de las membranas se bloquearon incubándolas durante 1 hora en tampón de bloqueo (Blocking Reagent, Roche) a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras el bloqueo, se incubaron con el anticuerpo primario preparado a las concentraciones indicadas en tampón de bloqueo durante toda la noche, a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron utilizando tampón tris salino (TBS)-Tween 20 (2 lavados de 15 minutos, a temperatura ambiente y en agitación suave) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, cabra anti-ratón o cabra anti-conejo (ECL™ anti-mouse IgG o ECL™ anti-rabbit IgG, GE Healthcare) diluido en tampón de bloqueo durante 1 hora, a temperatura ambiente y

en agitación suave. Tras la incubación, las membranas se lavaron en tampón TBS-Tween 20 (2 lavados de 15 minutos, a temperatura ambiente y en agitación suave) y se les aplicó ECL Prime (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. La señal quimioluminiscente se detectó utilizando películas de autorradiografía (Amersham™ Hyperfilm-ECL, GE Healthcare) y soluciones de revelado (Developer D-19, KODAK) y fijación (Rapid Fixer, ILFORD) siguiendo el protocolo descrito por los fabricantes. El análisis densitométrico de los Western blots se realizó con el programa QuantiScan (Biosoft). La β -actina se utilizó como control de carga.

5.1. Anticuerpos utilizados para Western blot

En la tabla se detallan los anticuerpos utilizados para Western blot y la dilución a la que se usaron.

Anticuerpo	Casa comercial	Peso molecular	Dilución
Anti-PARP	BD Biosciences	116 kDa y 85 kDa	1 500
Anti-CASP-9 activa	Cell Signaling	37 kDa	1 500
Anti-CASP-7 activa	Abcam	20 kDa	1 200
Anti-CASP-3 activa	Abcam	19 kDa	1 200
Anti-CASP-3 activa	Cell Signaling	17-19 kDa	1 500
Anti-Mcl-1	Santa Cruz	43 kDa	1 1000
Anti-Bcl-xL	Santa Cruz	30 kDa	1 100
Anti-Bcl-2	Calbiochem	24 kDa	1 500
Anti-Bak	BD Biosciences	24 kDa	1 3000
Anti-Bax	BD Biosciences	21 kDa	1 1000
Anti-BubR1	Bethyl Laboratories	125 kDa	1 5000
Anti-Ciclina B1	Santa Cruz	60 kDa	1 1000
Anti-p-Cdk1 ^{Tyr15}	Santa Cruz	34 kDa	1 1000
Anti-Pttg1	Santa Cruz	29 kDa	1 500
Anti-Pttg1	Dominguez et al. 1998	29 kDa	1 1000
Anti-p-Histona-3 ^{Ser10}	Santa Cruz	15 kDa	1 1000
Anti-PKC δ	Santa Cruz	77 kDa	1 3000
Anti- β -catenina total	Lab Vision/Neomarkers	92 kDa	1 15000
Anti- β -catenina activa	Millipore	92 kDa	1 500
Anti-c-Myc	Sigma	65 kDa	1 500
Anti-Ciclina D1	BD Biosciences	36 kDa	1 2000
Anti-AurKA	Novus	46 kDa	1 5000
Anti-p-Akt ^{Ser473}	Cell Signaling	60 kDa	1 1000
Anti-p-GSK3 β ^{Ser9}	Cell Signaling	46 kDa	1 1000
Anti-p-Mcl-1 ^{Ser159}	Cell Signaling	43 kDa	1 500
Anti β -Actina	Sigma	46 kDa	1:20000

Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados para Western blot. En la tabla se detallan los anticuerpos utilizados para este trabajo, indicando la casa comercial del mismo, el peso molecular de la proteína a la que va dirigido y la concentración a la que se utilizó en Western blot.

6. Ensayos de inmunoprecipitación

Las células sometidas a los diferentes tratamientos se tripsinizaron, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular se lavó en 1 ml de PBS. Nuevamente las células se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se lisaron con homogeneizadores de plástico en tampón de lisis CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilammonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato) con inhibidores de proteasas y fosfatasas. El uso de CHAPS, un detergente zwitteriónico, evita las interacciones artefactuales entre proteínas de la familia Bcl-2 observadas con el uso de detergentes no iónicos [149]. La concentración de proteínas de los lisados se cuantificó mediante el método BCA siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre 1 y 2 mg de proteínas de los lisados se incubaron con 80 µl de bolas de proteína A-sefarosa (GE Healthcare) durante 4 horas, en rotación a 4°C y, se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 rpm y a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se incubaron con suero normal de conejo (NRS, Oncogene) durante toda la noche, en rotación a 4°C. A continuación, se añadieron 80 µl de bolas de proteína A-sefarosa durante 4 horas, en rotación a 4°C y, nuevamente se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-Bak (BD Biosciences) o con NRS, durante 1 hora, en rotación a 4°C y los inmunocomplejos se precipitaron añadiendo 40 µl de bolas de proteína A-sefarosa e incubando durante 1 hora, en rotación a 4°C. Tras 4 lavados en tampón CHAPS y 2 lavados en tampón NP-40, se añadieron 15 µl de tampón de carga Laemmli a las bolas unidas a los inmunocomplejos y se hirvieron a 98°C durante 2 minutos en un termobloque. Finalmente, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida de gradiente 4-20% (Invitrogen) utilizando el tampón Tris-glicina 1× como electrolito.

Las proteínas del gel se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa aplicando un voltaje constante de 100 V durante 90-120 minutos. Las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con una solución de Ponceau S 1× para comprobar que las cantidades de proteínas de las diferentes condiciones eran comparables. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron durante 1 hora en tampón de bloqueo temperatura ambiente y en agitación suave. Tras el bloqueo, se incubaron con el anticuerpo anti-Bcl-xL (Santa Cruz) diluido en tampón de bloqueo (1:100) durante toda la noche, a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron en tampón TBS-Tween 20 (3 lavados de 10 minutos, a temperatura ambiente y en agitación suave) y se incubaron con

el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, cabra anti-ratón (GE Healthcare) diluido en tampón de bloqueo durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras la incubación, las membranas se lavaron en tampón TBS-Tween 20 (3 lavados de 10 minutos, a temperatura ambiente y en agitación suave) y se les aplicó ECL Prime. La señal quimioluminiscente se detectó utilizando películas de autorradiografía y soluciones de revelado y fijación. Esas mismas membranas se lavaron en tampón TBS-Tween 20 (3 lavados de 10 minutos, a temperatura ambiente y en agitación suave) y se reincubaron con el anticuerpo anti-Bak diluido en tampón de bloqueo (1:3000), repitiendo el proceso para la inmunodetección de Bak. El análisis densitométrico de los Western blots se realizó con el programa QuantiScan, corrigiendo las unidades densitométricas de la proteína Bcl-xL con las unidades densitométricas de la proteína Bak.

7. Preparación de geles de acrilamida

El sistema de geles utilizado fue un sistema discontinuo en el que el gel de poliacrilamida está formado por dos geles de distinta porosidad y pH. El gel inferior o “separador” determina la movilidad de las proteínas en función del tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros de acrilamida y bis-acrilamida. Los geles de poro mayor (5-7%) se utilizan para separar proteínas de alto peso molecular y los geles de poro menor (15-20%) se utilizan para separar proteínas de bajo peso molecular. El gel superior o “compactador” es de poro muy grande (4%) y provoca la compactación de la muestra de proteínas para que, al alcanzar la frontera que lo separa del “gel separador”, todas las proteínas se separen a partir del mismo frente de migración. En nuestro caso, utilizamos un porcentaje de acrilamida intermedio para el “gel separador” (8%) ya que permite una separación adecuada para la mayoría de proteínas.

Los geles de poliacrilamida se elaboraron en el laboratorio utilizando el Mini-Protean[®] System Casting Stand (Bio-Rad). Los reactivos utilizados para la preparación de los geles fueron una solución comercial de acrilamida:bisacrilamida (29:1) (Fluka, Sigma), tampón Tris-clorhídrico 1 M (pH: 6.8), tampón Tris-clorhídrico 1.5 M (pH: 8.8), SDS (Dodecil sulfato) al 10% (pH: 7.2), TEMED (N,N,N',N-tetraetilendiamina, Sigma) como agente iniciador de la polimerización y el anión persulfato (S₂O₈) en forma de persulfato amónico (APS, Gibco) como catalizador de la reacción de polimerización.

En primer lugar, todo el material necesario se lavó con agua bidestilada y se dejó secar con el objeto de eliminar cualquier partícula que impidiera la correcta polimerización de los geles. Posteriormente, se montaron los cristales de manera adecuada y se colocaron en el sistema de sujeción, se llenaron con agua bidestilada para comprobar que no se producían fugas y una vez comprobado esto, se retiró el agua bidestilada del molde formado por los cristales. La mezcla de los reactivos para la preparación del “gel separador” y el “gel compactador” se realizó a 4°C y añadiendo siempre en último lugar el APS y el TEMED. Primero se introdujo en el molde la mezcla del “gel separador”, dejando suficiente espacio para la posterior colocación del peine y se rellenoó este espacio con agua bidestilada, ya que el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Se permitió que la polimerización transcurriera a temperatura ambiente durante unos 15-20 minutos y tras esto, se retiró el agua bidestilada, se añadió la mezcla del “gel compactador”, se colocó el peine evitando que se formaran burbujas y de nuevo, se permitió la polimerización a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

8. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo

Tras realizar los diferentes tratamientos, las células se tripsinizaron, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular se lavó en 1 ml de PBS. Después de una nueva centrifugación de 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y las células se fijaron en etanol al 70%, resuspendiendo el botón en 300 µl de PBS frío e inyectando 700 µl de etanol absoluto frío. Una vez fijadas, se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm, se realizaron dos lavados en PBS y se incubaron con una solución de RNasa A 0,2 mg/ml (Sigma) durante 1 hora a 37°C. A continuación se incubaron con una solución de yoduro de propidio 20 µg/ml (Sigma) durante 15 minutos a 4°C y en oscuridad. El yoduro de propidio es un compuesto fluorescente que se intercala estequiométricamente en el DNA, de forma que las células que se encuentran en fase G₁, tienen una copia de DNA y una intensidad de fluorescencia 1×, las células en fase G₂/M tienen dos copias de DNA y una intensidad de fluorescencia 2×, y las células que están en fase S (fase de síntesis de DNA) tienen una intensidad de fluorescencia mayor que la de las células en fase G₁ y menor que la de las células en G₂/M. De forma que cuando las células teñidas con yoduro de propidio se pasaron por el citómetro de flujo (FACScan, BD Biosciences) utilizando el programa CellQuest Pro (BD Biosciences) para

la adquisición de datos, se generaron histogramas cuyos picos representan la población de células en fase G₁ y la población de células en G₂/M; con la población de células en fase S representada en forma de meseta comprendida entre ambos picos. El porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular se cuantificó utilizando el programa ModFit LT2 (Verity Software).

9. Hibridación fluorescente *in situ*

Las células se sometieron a diferentes tratamientos, se tripsinizaron, se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Tras un lavado en PBS y una nueva centrifugación de 10 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS realizando las improntas celulares sobre portaobjetos silanizados y dejando secar al aire. Después, se fijaron en una solución de metanol:ácido acético glacial (3:1) durante 10 minutos a -20°C y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos se sumergieron en una solución de citrato sódico salino (SSC) 2×/NP-40 0,3% durante 30 minutos a 37°C y seguidamente se deshidrataron en una serie de etanoles de concentración creciente y se dejaron secar al aire. A continuación, se añadió la mezcla de sondas centroméricas para los cromosomas 8 y 7 (Spectrum red y aqua, Vysis), se colocó un cubre y se selló la zona de hibridación con un adhesivo (Fixogum Rubber Cement, Marabu). El DNA celular y las sondas se co-desnaturalizaron durante 5 minutos a 72°C y se hibridaron durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Tras la hibridación, los portaobjetos se lavaron en una solución SSC 2×/NP-40 0,3% durante 5 minutos a 72°C. A continuación, los cristales se introdujeron en una solución PBD 1× (Detergente en tampón fosfato, MP Biomedicals) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se dejaron secar antes de la contratinción de los núcleos con DAPI. Finalmente, se visualizaron en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados y con una cámara digital y se contabilizó el número de señales para los cromosomas 8 y 17 por célula, en al menos 100 células de cada condición. Por último, se calculó el porcentaje de células con ploidía normal y el porcentaje de células con ploidía superior a la normal en cada caso.

10. Pacientes

Los estudios realizados en estos pacientes se llevaron a cabo con el consentimiento informado de los mismos y fueron aprobados por el comité ético.

10.1. Pacientes con cáncer de mama

Se construyó una matriz con tejidos fijados en formol e incluidos en parafina de 36 pacientes con cáncer de mama seleccionadas previamente, para participar en un ensayo clínico en el que fueron tratadas con 5-Fluoruracilo, epirubicina y ciclofosfamida (FEC) o con FEC más paclitaxel (FECP) [150]. El tratamiento en el grupo FEC consistió en 6 ciclos de 21 días de FEC (5-fluorouracilo a 600 mg/m² de superficie corporal, epirubicina a 90 mg/m² y ciclofosfamida 600 mg/m², administrado por vía intravenosa) y el tratamiento en el grupo FECP consistió en 4 ciclos de 21 días de la misma programación FEC y, 3 semanas después del tratamiento con FEC, 8 ciclos de 7 días de paclitaxel a 100 mg/m² a través de una infusión intravenosa de 60 minutos. La inclusión de las pacientes en el ensayo requería que hubieran sido sometidas a cirugía curativa primaria, que tuvieran al menos un ganglio linfático axilar afecto (estadio T1-T3), que no presentaran carcinoma ductal in situ y que tuvieran márgenes de resección libres de carcinoma invasivo. Se realizó el seguimiento de estas pacientes para valorar el tiempo libre de enfermedad, definido como el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta la aparición de recaída clínica, la aparición de un segundo cáncer o la muerte, independientemente de qué evento ocurriera en primer lugar.

10.2. Pacientes con cáncer de próstata

Se construyeron varias matrices de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina de 80 pacientes con cáncer de próstata que habían sido sometidos a prostatectomía radical y en los que dos patólogos independientes valoraron la puntuación de Gleason de acuerdo con los criterios convencionales [151].

11. Inmunohistoquímica

Secciones de 5 µm de los bloques de parafina con las matrices de tejidos de cáncer de mama y próstata se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en una serie gradada de alcoholes. A continuación se bloqueó la actividad peroxidasa endógena introduciendo las secciones en una solución acuosa de H₂O₂ al 3% durante 30 minutos y, después se

bloquearon los sitios de unión inespecíficos cubriendo las secciones con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. La recuperación antigénica para los anticuerpos anti Bcl-xL (Santa Cruz), anti-AURKA (Novus), anti-fosfo-GSK3 β ^{Ser9} (Cell Signaling) y anti-Mcl-1 (Santa Cruz) se realizó en microondas utilizando EDTA 1 mM pH: 9,0 (Dako); para el anticuerpo PKC δ (Abcam) se realizó con tripsina 1 mg/ml, 15 minutos a 37°C y para el anticuerpo anti- β -catenina activa (Millipore) se realizó con HCl 4 N, 15 minutos a temperatura ambiente seguido de tripsina 1 mg/ml, 15 minutos a 37°C. Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, las concentraciones utilizadas fueron anti-Bcl-xL (1:100), anti-AURKA (1:700), anti-fosfo-GSK3 β ^{Ser9} (1:25), anti-Mcl-1 (1:1200), anti PKC δ (1:400) y anti- β -catenina activa (1:200). Tras lavar con tampón Tris 0,05 M, se aplicaron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el sustrato cromogénico 3,3'-diaminobenzidina de acuerdo con el protocolo facilitado por el fabricante (EnVision, Dako). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en DPX (BDH Laboratories). La inmunotinción se evaluó por dos patólogos de manera independiente en al menos 10 campos utilizando un aumento de 200 \times ; y se puntuaron como baja expresión si menos del 25% de las células tumorales estaban teñidas intensamente y alta expresión si más del 25% de las células tumorales estaban teñidas intensamente.

12. Análisis estadístico

El análisis de las diferencias entre dos condiciones se realizó mediante el test *t* de Student para muestras pareadas. Las curvas de tiempo libre de enfermedad se calcularon por el método de Kaplan-Meier y la comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante el test log-rank de Mantel-Cox. La correlación entre la expresión de diferentes proteínas con el grado de Gleason o entre la expresión inmunohistoquímica de dos proteínas mediante el test de χ^2 o mediante el test exacto de Fisher. Para todos los análisis estadísticos realizados se usaron los programas Prism 4.0 o 6.0 (GraphPad) y el programa SPSS (IBM). En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando la *p* fue menor de 0.05.

Resultados, Discusión y Conclusiones

Los resultados obtenidos de la realización de esta Tesis Doctoral, están recogidos en dos artículos publicados por nuestro grupo de investigación:

- ➔ Flores ML, Castilla C, Ávila R, Ruiz-Borrego M, Sáez C, Japón MA. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 133(3):917-928. doi: 10.1007/s10549-011-1864-9.

- ➔ Flores ML, Castilla C, Gasca J, Medina R, Perez-Valderrama B, Romero F, Japón MA, Sáez C. Loss of PKC δ induces prostate cancer resistance to paclitaxel through activation of Wnt/ β -catenin pathway and Mcl-1 accumulation. *Mol Cancer Ther*. Aceptado 2016/04/07.

Bibliografía

1. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pocket companion to Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease (8 Edition). Elsevier 2009.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5):E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
3. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 2012; 13(8):790-801. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
4. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R, Martínez C. CIBERESP Working Group. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 3:iii30-36. doi: 10.1093/annonc/mdq090.
5. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol* 2013; 24(3):792-800. doi: 10.1093/annonc/mdt010.
6. Puig-Vives M, Sánchez MJ, Sánchez-Cantalejo J, Torrella-Ramos A, Martos C, Ardanaz E, Chirlaque MD, Perucha J, Díaz JM, Mateos A, Machón M, Marcos-Gragera R. Distribution and prognosis of molecular breast cancer subtypes defined by immunohistochemical biomarkers in a Spanish population-based study. *Gynecol Oncol* 2013; 130(3):609-614. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.05.039.
7. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on Her-2, p-53 and bcl2. *Ann Oncol* 2000; 11(6):647-663. doi: 10.1023/A:1008390429428.
8. Stenkuist B, Bengtsson E, Dahlqvist B, Eklund G, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B. Predicting breast cancer recurrence. *Cancer* 1982; 50(12):2884-2893. doi: 10.1002/1097-0142(19821215)50:3C2884::AID-CNCR2820501231%3E3.0.CO;2-K.
9. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, Lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63(1):181-187. doi: 10.1002/1097-0142(19890101)63:1% AID-CNCR2820630129%3E3.0.CO;2-H.
10. Schwartz GF, Finkel GC, Garcia JC, Patchefsky AS. Subclinical ductal carcinoma in situ of the breast. Treatment by local excision and surveillance alone. *Cancer* 1992; 70(10):2468-2474. doi: 10.1002/1097-0142(19921115)70:10%3C2468::AID-CNCR2820701013%3E3.0.CO;2-K.
11. Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR, Seenofsky GM, Coburn WJ, Gamagami P. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma. *Cancer* 1994; 73(3):664-667. doi: 10.1002/1097-0142(19940201)73:3C664::AID-CNCR2820730326%3E3.0.CO;2-S.
12. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node negative breast carcinoma. Analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long term follow up. *J Clin Oncol* 1993; 11(11): 2090-2100.
13. Simpson JF, Page DL. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol* 1994; 102(4 Suppl 1):S3-8.
14. Hopton DS, Thorogood J, Clayden AD, MacKinnon D. Histological grading of breast cancer: significance of grade on recurrence and mortality. *Eur J Surg Oncol* 1989; 15(1):25–31.
15. Thoresen S. Histological grading and clinical stage at presentation in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1982; 46(3): 457-458. doi: 10.1038/bjc.1982.226.
16. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, EDGE SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists. Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 124(7): 966-978.
17. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(16):2784-95. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.
18. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Pérez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, Van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(1):118-145. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2775.

19. Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol* 2015; 6(6):252-263. doi: 10.5306/wjco.v6.i6.252.
20. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet* 2005; 366(9503):2087-2106. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67887-7.
21. Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM). Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama metastásico. Guía GEICAM de práctica clínica 2015.
22. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *New Engl J Med* 2005; 353(16):1673-1684. doi: 10.1056/NEJMoa052122.
23. Gebhart MJ, Burzykowski T, Buyse M, Sledge G, Carmichael J, Luck HJ, Mackey JR, Nabholz JM, Paridaens R, Biganzoli L, Jassem J, Bontenbal M, Bonnetterre J, Chan S, Basaran GA, Therasse P. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(12):1980-1986. doi: 10.1200/JCO.2007.10.8399.
24. Dear RF, McGeechan K, Jenkins MC, Barratt A, Tattersall MHN, Wilcken N. Combination *versus* sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013; 12:CD008792. doi: 10.1002/14651858.CD008792.pub2.
25. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49(6):1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
26. Sarkar S, Das S. A review of imaging methods for prostate cancer detection. *Biomed Eng Comput Biol* 2016; 7(Suppl 1):1-15. doi: 10.4137/BECB.S34255.
27. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111(1):58-64.
28. Uzgare AR, Isaacs JT. Prostate cancer: potential targets of anti-proliferative and apoptotic signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(4):707-714. doi: 10.1056/j.biocel.2004.11.018.
29. Wadosky KM, Koochekpour S. Therapeutic rationales, progresses, failures, and future directions for advanced prostate cancer. *Int J Biol Sci* 2016; 12(4):409-426. doi: 10.7150/ijbs.14090.
30. Adolfsson J. Watchful waiting and active surveillance: the current position. *BJU Int* 2008; 102(1):10-14. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07585.x.
31. Pound CR, Partin AW, Epstein JI, Walsh PC. Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control. *Urol Clin North Am* 1997; 24(2):395-406. doi: 10.1016/S0094-0143(05)70386-4.
32. Nilsson S, Norlen BJ, Widmarks A. A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer. *Acta Oncol* 2004; 43(4):316-381. doi: 10.1080/02841860410030661.
33. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941; 1:293-297.
34. Isaacs JT, Isaacs WB. Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nat Med* 2004; 10(1):26-27. doi: 10.1038/nm0104-26.
35. Bruckheimer EM, Kyprianou N. Apoptosis in prostate carcinogenesis. A growth regulator and a therapeutic target. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1):153-162. doi: 10.1007/s004410000196.
36. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000; 14(19):2410-2434. doi: 10.1101/gad.819500.
37. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010; 24(18):1967-2000. doi: 10.1101/gad.1965810.
38. Chi KN, Bjartell A, Dearnaley D, Sad F, Schröder FH, Sternberg C, Tombal B, Visakorpi T. *Eur Urol* 2009; 56(4):594-605. doi: 10.1016/j.eururo.2009.06.027.
39. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
40. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17(20):2481-2495. doi: 10.1101/gad.1126903.

41. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8):2013-2026. doi: 10.1002/1097-0142(19940415)73:8%3C2013::AID-CNCR2820730802%3E3.0.CO;2-J.
42. Salvesen GS. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 2002; 38:9-19. doi: 10.1042/bse0380009.
43. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-776. doi: 10.1038/35037710.
44. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-776. doi: 10.1038/35037710.
45. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 2009; 284(33):21777-21781. doi: 10.1074/jbc.R800084200.
46. Locksley RM, Kileen N, Leonardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4):487-501. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00237-9.
47. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381):1305-1308. doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
48. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 2010; 316(6):887-899. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.12.011.
49. Kollek M, Müller A, Egle A, Erlacher M. Bcl-2 proteins in development, health and disease of the hematopoietic system. *FEBS J* 2016. doi: 10.1111/febs.13683.
50. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; 112(4):481-490. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00116-8.
51. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; 37(3):299-310. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.025.
52. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33533-33539. doi: 10.1074/jbc.273.50.33533.
53. Um HD. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget* 2015. doi:10.18632/oncotarget.6405.
54. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; 26(9):1324-1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220.
55. Ogretmen B, Safa AR. Down-regulation of apoptosis related bcl-2 but not bcl-xL or bax proteins in multidrug-resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1996; 67(5):608-614. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960904)67:5<608::AID-IJC3>3.0.CO;2-Y.
56. Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4(2):153-164. doi: 10.1023/A:1018773123899.
57. Simões-Wüst AP¹, Schürpf T, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Bcl-2/bcl-xL bispecific antisense treatment sensitizes breast carcinoma cells to doxorubicin, paclitaxel and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76(2):157-166. doi: 10.1023/A:1020543004400.
58. Sjöström J, Blomqvist C, von Boguslawski K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmström P, Ostenstadt B, Wist E, Valvere V, Takayama S, Reed JC, Saksela E. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8(3):811-816.
59. Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A. Treatment of MCF-7 cells with taxol and etoposide induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BCL2L12, BAX, CASPASE-9 and FAS. *Biol Chem* 2006; 387(8):1081-1086. doi: 10.1515/BC.2006.133.
60. Kim HA, Yom CK, Moon BI, Choe KJ, Sung SH, Han WS, Choi HY, Kim HK, Park HK, Choi SH, Yoon EJ, Oh SY. The use of an in vitro adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict chemotherapeutic response in breast cancer. *Breast* 2008; 17(1):19-26. doi:10.1016/j.breast.2007.06.00Z.
61. Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y, Xiong W, Li G, Lu J, Fodstad O, Riker AI, Tan M. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J Biol Chem* 2010; 285(28):21496-21507. doi:10.1074/jbc.M109.083337.
62. Liu QY, Stein CA. Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression. *Clin Cancer Res* 1997; 3(11):2039-2046.
63. Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I, Denner L, Marcelli M. Overexpression of BCL-XL underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res* 2001; 61(4):1699-1706.

63. Kojima H, Endo K, Moriyama H, Tanaka Y, Alnemri ES, Slapak CA, Teicher B, Kufe D, Datta R. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* 1998; 273(27):16647-16650. doi: 10.1074/jbc.273.27.16647.
64. Castilla C, Congregado B, Chinchón D, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C. Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology* 2006; 146(10):4960-4967. doi: 10.1210/en.2006-0502.
65. Marcelli M, Marani M, Li X, Sturgis L, Haidacher SJ, Trial JA, Mannucci R, Nicoletti I, Denner L. Heterogeneous apoptotic responses of prostate cancer cell lines identify an association between sensitivity to staurosporine induced apoptosis, expression of Bcl-2 family members, and caspase activation. *Prostate* 2000; 42(4):260-273. doi: 10.1002/(SICI)1097-0045(20000301)42:4%3C260::AID-PROS3%3E3.0.CO;2-0.
66. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 1998; 391(6663):199-203. doi: 10.1038/34465.
67. Ludueña RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 1998; 178:207-275.
68. Amos L, Klug A. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* 1974; 14(3):523-549.
69. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5(1):65-71. doi: 10.2174/1568011053352569.
70. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* 1988; 107(4):1437-1448. doi: 10.1083/jcb.107.4.1437.
71. Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev* 2011; 31(3):443-481. doi: 10.1002/med.20242.
72. Hotani H, Horio T. Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988; 108(1-2):229-236.
73. Kirschner MW, Mitchison T. Microtubule dynamics. *Nature* 1986; 324(6098):621. doi: 10.1038/324621a0.
74. Cassimeris LU, Walker RA, Pryer NK, Salmon ED. Dynamic instability of microtubules. *Bioessays* 1987; 7(4):149-154. doi: 10.1002/bies.950070403.
75. Cassimeris L. Regulation of microtubule dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993; 26(4):275-281. doi: 10.1002/cm.970260402.
76. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13(1):83-117. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.
77. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(4):253-265. doi: 10.1038/nrc1317.
78. Rezanian V, Azarenko O, Jordan MA, Bolterauer H, Ludueña RF, Huzil JT, Tuszynski JA. Microtubule Assembly of Isotypically Purified Tubulin and Its Mixtures. *Biophys J* 2008; 95(4):1993-2008. doi: 10.1529/biophysj.108.132233.
79. Walczak CE, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(2):91-102. doi: 10.1038/nrm2832.
80. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(20):9552-9556. doi: 10.1073/pnas.90.20.9552.
81. Borisy GG, Taylor EW. The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J Cell Biol* 1967 34(2):525-533. doi: 10.1083/jcb.34.2.525.
82. Borisy GG, Taylor EW. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J Cell Biol* 1967; 34(2):535-548. doi: 10.1083/jcb.34.2.535.
83. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(10):790-803. doi: 10.1038/nrd3253.
84. Mani S, Macapinlac MJr, Goel S, Verdier-Pinard D, Fojo T, Rothenberg M, Colevas D. The clinical development of new mitotic inhibitors that stabilize the microtubule. *Anticancer Drugs* 2004; 15(6):553-558. doi: 10.1097/01.cad.0000131681.21637.b2.
85. Trigili C, Pera B, Barbazanges M, Cossy J, Meyer C, Pineda O, Rodriguez-Esrich C, Urpi F, Vilarrasa J, Diaz J.F, Barasoain I. Mechanism of action of the cytotoxic macrolides amphidinolide X and J. *ChemBiochem* 2011; 12(7):1027-1030. doi: 10.1002/cbic.201100042.
86. Morris PG, Fornier MN. Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res* 2008; 14(22):7167-7172. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0169.
87. Altmann KH, Gertsch J. Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat Prod Rep* 2007; 24(2):327-357. doi: 10.1039/B515619J.

88. Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB life* 2008; 60(6):368-375. doi: 10.1002/iub.42.
89. Díaz JZ, Andreu JM. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* 1993; 332(11):2747-2755.
90. Hudes GR, Greenberg R, Krigel RL, Fox S, Scher R, Litwin S, Watts P, Speicher L, Tew K, Comis R. Phase II study of estramustine and vinblastine, two microtubule inhibitors, in hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10(11):1754-1761.
91. Infante JR, Yardley DA, Burris HA 3rd, Greco FA, Farley CP, Webb C, Spigel DR, Hainsworth JD. Phase II trial of weekly docetaxel, vinorelbine, and trastuzumab in the first-line treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer* 2009; 9(1):23-28. doi: 10.3816/CBC.2009.n.004.
92. William WN Jr, Khuri FR, Fossella FV, Glisson BS, Zinner RG, Lee JJ, Herbst RS, Lippman SM, Kim ES. Phase II study of vinorelbine and docetaxel in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer as frontline and second-line therapy. *Am J Clin Oncol* 2010; 33(2):148-152. doi: 10.1097/COC.0b013e318199fb99.
93. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents, VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93(9):2325-2327. doi: 10.1021/ja00738a045.
94. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277(5698):665-667. doi: 10.1038/277665a0.
95. Montero 2005 → Montero A., Fossella F, Hortobagyi G, Valero V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol* 2005; 6(4):229-239. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70094-2.
96. Gridelli C, Aapro M, Ardizzoni A, Balducci L, De Marinis F, Kelly K, Le Chevalier T, Manegold C, Perrone F, Rosell R, Shepherd F, De Petris L, Di Maio M, Langer C. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer in the elderly: results of an international expert panel. *J Clin Oncol* 2005; 23(13):3125-3137. doi: 10.1200/JCO.2005.00.224.
97. Markman, M. Antineoplastic agents in the management of ovarian cancer: current status and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29(10):515-519. doi: 10.1016/j.tips.2008.07.007.
98. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003; 22(47):7280-7295. doi: 10.1038/sj.onc.1206934.
99. Morris ME, Dave RA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of phenethyl isothiocyanate: Implications in breast cancer prevention. *The APPS Journal* 2014; 16(4):705-713. doi: 10.1208/s12248-014-9610-y.
100. Gupta P, Wright SE, Kim SH, Srivastava SK. Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846(2):405-424. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.08.003.
101. Wang LG, Chiao JW. Prostate cancer chemopreventive activity of phenethyl isothiocyanate through epigenetic regulation (review). *Int J Oncol.* 2010; 37(3):533-539. doi: 10.3892/ijo_00000702.
102. Castilla C, Chinchón D, Medina R, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C. PTPL1 and PKC δ contribute to proapoptotic signalling in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 2013; 4:e576. doi: 10.1038/cddis.2013.90.
103. Hecht SS. Chemoprevention of lung cancer by isothiocyanates. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 401:1-11. doi: 10.1007/978-1-4613-0399-2_1.
104. Gupta P, Srivastava SK. Antitumor activity of phenethyl isothiocyanate in HER2-positive breast cancer models. *BMC Med* 2012; 10:80. doi: 10.1186/1741-7015-10-80.
105. Xiao D, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate sensitizes androgen-independent human prostate cancer cells to docetaxel-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Pharm Res* 2010; 27(4):722-31. doi: 10.1007/s11095-010-0079-9.
106. Tseng E, Kamath A, Morris ME. Effect of organic isothiocyanates on the P-glycoprotein- and MRP1-mediated transport of daunomycin and vinblastine. *Pharm Res* 2002; 19(10):1509-1515. doi: 10.1023/A:1020460700877.
107. Wang X, Govind S, Sajankila SP, Mi L, Roy R, Chung FL. Phenethyl isothiocyanate sensitizes human cervical cancer cells to apoptosis induced by cisplatin. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(10):1572-1581. doi: 10.1002/mnfr.201000560.
108. Wu X, Zhou QH, Xu K. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30(5):501-512. doi: 10.1038/aps.2009.50.

109. van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 2006; 16(2):203-213. doi: 10.1038/sj.cr.73100028.
110. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5):379-393. doi: 10.1038/nrm2163.
111. Ciliberto A, Shah JV. A quantitative systems view of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J* 2009; 28(15):2162-2173. doi: 10.1038/emboj.2009.186.
112. Matsuyoshi S, Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Konishi N. Bcl-2 phosphorylation has pathological significance in human breast cancer. *Pathobiology* 2006; 73(4):205-212. doi: 10.1159/000096022.
113. Basu A, DuBois G, Haldar S. Posttranslational modifications of Bcl2 family members—a potential therapeutic target for human malignancy. *Front Biosci* 2006; 11(1):1508-1521. doi: 10.2741/1900.
114. Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 2003; 22(56):9075-9086. doi: 10.1038/sj.onc.1207233.
115. Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* 2008; 14(2):111-122. doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.002.
116. Brito DA, Rieder CL. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* 2006; 16(12):1194-1200. doi: 10.1016/j.cub.2006.04.043.
117. Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell* 2004; 7(5):637-651. doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.002.
118. Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 15):2579-2585. doi: 10.1242/jcs.039719.
119. Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem* 2002; 132(4): 509-511. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003249.
120. Roffey J, Rosse C, Linch M, Hibbert A, McDonald NQ, Parker PJ. Protein kinase C intervention: the state of play. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(2): 268-279. doi: 10.1016/j.ccb.2009.01.019.
121. Newton AC. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298(3):E395-402. doi: 10.1152/ajpendo.00477.2009.
122. Moscat J, Rennert P, Diaz-Meco MT. PKC ζ at the crossroad of NF- κ B and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell Death Differ* 2006; 13(5): 702-711. doi: 10.1038/sj.cdd.4401823.
123. Reyland ME. Protein kinase C δ and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5):1001-1004. doi: 10.1042/BST0351001.
124. Grinner M, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(4):281-294. doi:10.1038/nrc2110.
125. Zhao M, Xia L, Chen GQ. Protein kinase c δ in apoptosis: a brief review. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60(5):361-372. doi: 10.1007/s00005-012-0188-8.
126. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(12): 937-957. doi: 10.1038/nrd3871.
127. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982; 257(13): 7847-7851.
128. Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol Cell Biol* 1997; 17(6):3418-3428. doi: 10.1128/MCB.17.6.3418.
129. Basu A, Pal D. Two faces of protein kinase C δ : the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *Sci World J* 2010; 16; 10:2272-2284. doi: 10.1100/tsw.2010.214.
130. Jackson DN, Foster DA. The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J* 2004; 18(6):627-636. doi: 10.1096/fj.03-0979rev.
131. Basu A. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Mol Med* 2003; 7(4):341-350. doi: 10.1111/j.1582-4934.2003.tb00237.x.
132. Leitges M, Mayr M, Braun U, Mayr U, Li C, Pfister G, Ghaffari-Tabrizi N, Baier G, Hu Y, Xu Q. Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase Cdelta-null mice. *J Clin Invest* 2001; 108(10):1505-1512. doi: 10.1172/JCI200112902.
133. Humphries M, Limesand KH, Schneider JC, Nakayama KI, Anderson SM, Reyland ME. Suppression of apoptosis in the protein kinase C delta null mouse in vivo. *J Biol Chem* 2006; 281(14):9728-9737. doi: 10.1074/jbc.M507851200.

134. Li L, Lorenzo PS, Bogi K, Blumberg PM, Yuspa SH. Protein kinase C delta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol* 1999; 19(12):8547-8558. doi: 10.1128/MCB.19.12.8547.
135. Akakura, S, Nochajski P, Gao L, Sotomayor P, Matsui S, Gelman IH. Rb-dependent cellular senescence, multinucleation and susceptibility to oncogenic transformation through PKC scaffolding by SSeCKS/AKAP12. *Cell Cycle* 2010; 9(23): 4656-4665. doi: 10.4161/cc.9.23.13974.
136. Hernández-Maqueda JG, Luna-Ulloa LB, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Protein kinase C delta negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines. *PLoS One* 2013; 8(3):e58540. doi: 10.1371/journal.pone.0058540.
137. Yang L, Perez AA, Fujie S, Warden C, Li J, Wang Y, Yung B, Chen YR, Liu X, Zhang H, Zheng S, Liu Z, Ann D, Yen Y. Wnt modulates MCL1 to control cell survival in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2014; 14:124. doi: 10.1186/1471-2407-14-124.
138. Kim J, Koyanagi T, Mochly-Rosen D. PKC δ activation mediates angiogenesis via NADPH oxidase activity in PC3 prostate cancer cells. *Prostate* 2011; 71(9):946-954. doi: 10.1002/pros.21310.
139. Kharait S, Dhir R, Lauffenburger D, Wells A. Protein kinase C delta signaling downstream of the EGF receptor mediates migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343(3):848-56. doi: 10.1016/j.bbcr.2006.03.044.
140. Villar J, Arenas MI, MacCarthy CM, blánquez MJ, Tirado OM, Notario V. PCPH/ENTPD5 expression enhances the invasiveness of human prostate cancer cells by a protein kinase C delta-dependent mechanism. *Cancer Res* 2007; 67(22):10859-10868. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2041.
141. Yu HS, Lin TH, Tang CH. Bradykinin enhances cell migration in human prostate cancer cells through B2 receptor/PKC δ /c-Src dependent signaling pathway. *Prostate* 2013; 73(1):89-100. doi: 10.1002/pros.22544.
142. Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, Asano T, Kuroki T, Asano T, Hayakawa M. Protein kinase C delta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest* 2002; 109(6):827-836. doi: 10.1172/JCI0214146.
143. Sumitomo M, Asano T, Asakuma J, Asano T, Nanus DM, Hyakawa M. Chemosensitization of androgen-independent prostate cancer with neutral endopeptidase. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1 Pt 1):260-266. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0798-3.
144. Gonzalez-Guerrico AM, Kazanietz MG. Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade A KEY ROLE FOR PROTEIN KINASE C δ . *J Biol Chem* 2005; 280(47):38982-38991. doi: 10.1074/jbc.M506767200.
145. Xiao L, Gonzalez-Guerrico A, Kazanietz MG. PKC-mediated secretion of death factors in LNCaP prostate cancer cells is regulated by androgens. *Mol Carcinog* 2009; 48(3):187-195. doi: 10.1002/mc.20476.
146. von Burstin VA, Xiao L, Kazanietz MG. Bryostatins 1 inhibits phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by differentially modulating protein kinase C (PKC) δ translocation and preventing PKC δ -mediated release of tumor necrosis factor- α . *Mol Pharmacol* 2010; 78(3):325-332. doi: 10.1124/mol.110.064741.
147. Lu PH, Yu CC, Chiang PC, Chen YC, Ho YF, Kung FL, Guh JH. Paclitaxel induces apoptosis through activation of nuclear protein kinase C- δ and subsequent activation of Golgi associated Cdk1 in human hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 2011; 186(6):2434-2441. doi: 10.1016/j.juro.2011.07.088.
148. Gurbuz N, Park MA, Dent P, Abdel Mageed AB, Sikka SC, Baykal A. Cystine dimethyl ester induces apoptosis through regulation of PKC- δ and PKC- ϵ in prostate cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2015; 15(2):217-227. doi: 10.2174/1871520614666141120121901.
149. Hsu YT, Youle RJ. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272(21):13829-13839. doi:10.1074/jbc.272.21.13829.

150. Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, Alba E, Calvo L, Ruiz-Borrego M, Munárriz B, Rodríguez CA, Crespo C, de Alava E, López García-Asenjo JA, Guitián MD, Almenar S, González-Palacios JF, Vera F, Palacios J, Ramos M, Gracia Marco JM, Lluch A, Alvarez I, Seguí MA, Mayordomo JJ, Antón A, Baena JM, Plazaola A, Modolell A, Pelegrí A, Mel JR, Aranda E, Adrover E, Alvarez JV, García Puche JL, Sánchez-Rovira P, Gonzalez S, López-Vega JM; GEICAM 9906 Study Investigators. Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(11):805–814. doi:10.1093/jnci/djn151.
151. Lopez-Beltran A, Mikuz G, Luque RJ, Mazzucchelli R, Montironi R. Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma. *Virchows Arch* 2006; 448(2):111-118. doi: 10.1007/s00428-005-0102-4.
152. Shi J, Orth JD, Mitchison T. Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res* 2008; 68(9):3269-3276. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6699.
153. Ramos-Morales F, Domínguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, Tortolero M. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene* 2000, 19(3):403-409. doi: 10.1038/sj.onc.1203320.
154. Lee JJ, Loh K, Yap YS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med* 2015; 12(4):342-354. doi: 10.74977/j.issn.2095-3941.2015.0089.
155. Castilla C, Flores ML, Medina R, Pérez-Valderrama B, Romero F, Tortolero M, Japón MA, Sáez C. Prostate cancer cell response to paclitaxel is affected by abnormally expressed securin PTTG1. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(10):2372-2383. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0405.
156. Iqbal S, Zhang S, Driss A, Liu ZR, Kim HR, Wang Y, Ritenour C, Zhou HE, Kucuk O, Chung LW, Wu D. PDGF upregulates Mcl-1 through activation of β -catenin and HIF-1 α -dependent signaling in human prostate cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(1):e30764. doi: 10.1371/journal.pone.0030764.
157. Hsu KH, Tsai HW, Lin PW, Hsu YS, Lu PJ, Shan YS. Antiapoptotic effects of osteopontin through the up-regulation of Mcl-1 in gastrointestinal stromal tumors. *World J Surg Oncol* 2014; 12:189. doi: 10.1186/1477-7819-12-189.
158. Dutta-Simmons J, Zhang Y, Gorgun G, Gatt M, Mani M, Hideshima T, Takada K, Carlson NE, Carrasco DE, Tai YT, Raje N, Letai AG, Anderson KC, Carrasco DR. Aurora kinase A is a target of Wnt/ β -catenin involved in multiple myeloma disease progression. *Blood* 2009; 114(13):2699-2708. doi: 10.1182/blood-2008-12-194290.
159. Yao JE, Yan M, Guan Z, Pan CB, Xia LP, Li CX, Wang LH, Long ZJ, Zhao Y, Li MW, Zheng FM, Xu J, Lin DJ, Liu Q. Aurora-A down-regulates IkappaBalpha via Akt activation and interacts with insulin-like growth factor-1 induced phosphatidylinositol 3-kinase pathway for cancer cell survival. *Mol Cancer* 2009; 8:95. doi: 10.1186/1476-4598-8-95.
160. Guan Z, Wang XR, Zhu XF, Huang XF, Xu J, Wang LH, Wan XB, Long ZJ, Liu JN, Feng GK, Huang W, Zeng YX, Chen FJ, Liu Q. Aurora-A negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(21):10436-10444. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1379.
161. Dar AA, Belkhir A, El-Rifai W. The aurora kinase A regulates GSK-3 β in gastric cancer cells. *Oncogene* 2009; 28(6):866-875. doi: 10.1038/onc.2008.434.
162. Li C, Zhou C, Wang S, Feng Y, Lin W, Lin S, Wang Y, Huang H, Liu P, Mu YG, Shen X. Sensitization of glioma cells to tamoxifen-induced apoptosis by PI3-kinase inhibitor through the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *PLoS One* 2011; 6(10):e27053. doi: 10.1371/journal.pone.0027053.
163. Sun NK, Huang SL, Chang TC, Chao CC. Sorafenib induces endometrial carcinoma apoptosis by inhibiting Elk-1-dependent Mcl-1 transcription and inducing Akt/GSK3 β -dependent protein degradation. *J Cell Biochem* 2013; 114(8):1819-1831. doi: 10.1002/jbc.24530
164. Ren H, Koo J, Guan B, Yue P, Deng X, Chen M, Khuri FR, Sun SY. The E3 ubiquitin ligases β -TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. *Mol Cancer* 2013; 12:14. doi: 10.1186/1476-4598-12-146.
165. Karthigeyan D, Prasad SB, Shandilya J, Agrawal S, Kundu TK. Biology of Aurora A kinase: implications in cancer manifestation and therapy. *Med Res Rev* 2011; 31(5):757-793. doi: 10.1002/med.20203.
166. Wu X, Lou F, Li J, Zhong X, Liu K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *Int J Oncol* 2016. doi: 10.3892/ijo.2016.3360.

167. Tabuchi Y, Matsuoka J, Gunduz M, Imada T, Ono R, Ito M, Motoki T, Yamatsuji T, Shirakawa Y, Takaoka M, Haisa M, Tanaka N, Kurebayashi J, Jordan VC, Naomoto Y. Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. *Int J Oncol* 2009; 34(2):313-319. doi: 10.3892/ijo_00000153.
168. Blagosklonny MV. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle* 2007; 6(1):70-74. doi: 10.4161/cc.6.1.3682.
169. Huang HC, Shi J, Orth JD, Mitchison TJ. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* 2009; 16(4):347-358. doi: 10.1016/j.ccr.2009.08.020.
170. Arisan ED, Kutuk O, Tezil T, Bodur C, Telci D, Basaga H. Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119(2):271-281. doi: 10.1007/s10549-009-0343-z.
171. Blagosklonny MV, Robey R, Sheikh MS, Fojo T. Paclitaxel-induced FasL-independent apoptosis and slow (non-apoptotic) cell death. *Cancer Biol Ther* 2002; 1(2):113-117. doi: 10.4161/cbt.53.
172. Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy. The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 2005; 8(1):7-12. doi: 10.1016/j.ccr.2005.06.011.
173. Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT. Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res* 2004; 64(7):2502-2508. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2013.
174. Kim HS, Jeon YK, Ha GH, Park HY, Kim YJ, Shin HJ, Lee CG, Chung DH, Lee CW. Functional interaction between BubR1 and securin in an anaphase-promoting complex/cyclosome Cdc20-independent manner. *Cancer Res* 2009; 69(1):27-36. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0820.
175. Riffell JL, Zimmerman C, Khong A, McHardy LM, Roberge M. Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. *Cell Cycle* 2009; 8(18):3025-3038. doi: 10.4161/cc.8.18.9623.
176. Bekier ME, Fischbach R, Lee J, Taylor WR. Length of mitotic arrest induced by microtubule-stabilizing drugs determines cell death after mitotic exit. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(6):1646-1654. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1084.
177. Kutuk O, Letai A. Displacement of Bim by Bmf and Puma rather than increase in Bim level mediates paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2010; 17(10):1624-1635. doi: 10.1038/cdd.2010.41.
178. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6):3509-3517. doi: 10.1128/MCB.18.6.3509.
179. Chi K, Hotte SJ, Joshua AM, North S, Wyatt AW, Collins LL, Saad F. Treatment of mCRPC in the AR-axis-targeted therapy-resistant state. *Ann Oncol* 2015; 26(10):2044-2056. doi: 10.1093/annonc/mdv267.
180. Ho CH, Hsu JL, Liu SP, Hsu LC, Chang WL, Chao CC, Guh JH. Repurposing of phentolamine as a potential anticancer agent against human castration-resistant prostate cancer: A central role on microtubule stabilization and mitochondrial apoptosis pathway. *Prostate* 2015; 75(13):1454-1466. doi:10.1002/pros.13033.
181. Zhu Y, Zhou Y, Shi J. Post-slippage multinucleation renders cytotoxic variation in anti-mitotic drugs that target microtubules or mitotic spindle. *Cell Cycle* 2014; 13(11):1756-1764. doi: 10.4161/cc.28672.
182. Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J* 2010; 29(14):2407-2420. doi: 10.1038/emboj.2010.112.
183. Casás-Selves M, Kim J, Zhang Z, Helfrich BA, Gao D, Porter CC, Scarborough HA, Bunn PA Jr, Chan DC, Tan AC, DeGregori J. Tankyrase and the canonical Wnt pathway protect lung cancer cells from EGFR inhibition. *Cancer Res* 2012; 72(16):4154-4164. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2848.
184. Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Anticancer efficacy of deguelin in human prostate cancer cells targeting glycogen synthase kinase-3 β/β -catenin pathway. *Int J Cancer* 2011; 129(12):2916-2927. doi: 10.1002/ijc.25949.
185. Chikazawa N, Tanaka H, Tasaka T, Nakamura M, Tanaka M, Onishi H, Katano M. Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Res* 2010; 30(6):2041-2048.

186. Liu Z, Zhu G, Getzenberg RH, Veltri RW. The upregulation of PI3K/Akt and MAP kinase pathways is associated with resistance of microtubule-targeting drugs in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2015; 116(7):1341-9. doi: 10.1002/jcb.25091.
187. Park N, Baek HS, Chun YJ. Embelin-induced apoptosis of human prostate cancer cells is mediated through modulation of Akt and β -Catenin signaling. *PLoS One* 2015; 10(8):e0134760. doi: 10.1371/journal.pone.0134760.
188. Morita N, Uemura H, Tsumatani K, Cho M, Hirao Y, Okajima E, Konishi N, Hiasa Y. E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression in prostate cancers: correlation with tumour invasion. *Br J Cancer* 1999; 79(11-12):1879-1883. doi: 10.1038/sj.bjc.6690299.
189. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, Rabbani SA. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 2004; 101(6):1345-1356. doi: 10.1002/cncr.20518.
190. van Oort IM, Tomita K, van Bokhoven A, Bussemakers MJ, Kiemeneys LA, Karthaus HF, Witjes JA, Schalken JA. The prognostic value of E-cadherin and the cadherin-associated molecules alpha-, beta-, gamma-catenin and p120ctn in prostate cancer specific survival: a long-term follow-up study. *Prostate* 2007; 67(13):1432-1438. doi: 10.1002/pros.20626.
191. Whitaker HC, Girling J, Warren AY, Leung H, Mills IG, Neal DE. Alterations in beta-catenin expression and localization in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68(11):1196-1205. doi: 10.1002/pros.20780.
192. Jung SJ, Oh S, Lee GT, Chung J, Min K, Yoon J, Kim W, Ryu DS, Kim IY, Kang DI. Clinical significance of Wnt/ β -Catenin signaling and androgen receptor expression in prostate cancer. *World J Mens Health* 2013; 31(1):36-46. doi: 10.5534/wjmh.2013.31.1.36.
193. Behnsawy HM, Miyake H, Harada K, Fujisawa M. Expression patterns of epithelial-mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy. *BJU Int* 2013; 111(1):30-37. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11551.x.
194. Lazari P, Poulias H, Gakiopoulou H, Thomopoulou GH, Barbatis C, Lazaris AC. Differential immunohistochemical expression of CD44s, E-cadherin and β -catenin among hyperplastic and neoplastic lesions of the prostate gland. *Urol Int* 2013; 90(1):109-116. doi: 10.1159/000345057.
195. Ipekci T, Ozden F, Unal B, Saygin C, Uzunaslán D, Ates E. Epithelial-mesenchymal transition markers β -catenin, Snail, and E-Cadherin do not predict disease free survival in prostate adenocarcinoma: a prospective study. *Pathol Oncol Res* 2015; 21(4):1209-1216. doi: 10.1007/s12253-015-9958-z.
196. Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, Wang Y, Sheikh KL, Terry S, Tagawa ST, Dhir R, Nelson JB, de la Taille A, Allory Y, Gerstein MB, Perner S, Pienta KJ, Chinnaiyan AM, Wang Y, Collins CC, Gleave ME, Demichelis F, Nanus DM, Rubin MA. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discov* 2011; 1(6):487-495. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0130.
197. Qu Y, Huang X, Li Z, Liu J, Wu J, Chen D, Zhao F, Mu D. miR-199a-3p inhibits aurora kinase A and attenuates prostate cancer growth: new avenue for prostate cancer treatment. *Am J Pathol* 2014; 184(5):1541-1549. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.017.
198. Li Z, Sun Y, Chen X, Squires J, Nowroozizadeh B, Liang C, Huang J. p53 mutation directs AURKA overexpression via miR-25 and FBXW7 in prostatic neuroendocrine carcinoma. *Mol Cancer Res* 2015; 13(3):584-591. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0277-T.
199. Xing Z, Gao S, Duan Y, Han H, Li L, Yang Y, Li Q. Delivery of DNzyme targeting aurora kinase A to inhibit the proliferation and migration of human prostate cancer. *Int J Nanomedicine* 2015; 10:5715-5727. doi: 10.2147/IJN.S90559.
200. Lee EC, Frolov A, Li R, Ayala G, Greenberg NM. Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(10):4996-5002. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2796.
201. Kumano M, Miyake H, Terakawa T, Furukawa J, Fujisawa M. Suppressed tumour growth and enhanced chemosensitivity by RNA interference targeting Aurora-A in the PC3 human prostate cancer model. *BJU Int* 2010; 106(1):121-127. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.09047.x.
202. Li R, Erdamar S, Dai H, Sayeeduddin M, Frolov A, Wheeler TM, Ayala GE. Cytoplasmic accumulation of glycogen synthase kinase-3 β is associated with aggressive clinicopathological features in human prostate cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(6):2077-2081.
203. Darrington RS, Campa VM, Walker MM, Bengoa-Vergniory N, Gorróno-Etxebarria I, Uysal-Onganer P, Kawano Y, Waxman J, Kypta RM. Distinct expression and activity of GSK-3 α and GSK-3 β in prostate cancer. *Int J Cancer* 2012; 131(6):E872-883. doi: 10.1002/ijc.27620.

204. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148(5):1567-1576.
205. Guturi KK, Mandal T, Chatterjee A, Sarkar M, Bhattacharya S, Chatterjee U, Ghosh MK. Mechanism of β -catenin-mediated transcriptional regulation of epidermal growth factor receptor expression in glycogen synthase kinase 3 β -inactivated prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2012; 287(22):18287-18296. doi: 10.1074/jbc.M111.324798.

Anexo I. Recetas

Las recetas se detallan en el orden de aparición en el texto.

Medio RPMI 1640 suplementado

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
Medio RPMI 1640		435 ml
Suero fetal bovino	10%	50 ml
L-Glutamina 200 mM	2 mM	5 ml
Hepes 1 M	10 mM	5 ml
Solución Penicilina-Estreptomicina 5000 U/ml-5 mg/ml	50 U/ml y 50 µg/ml	5ml

Medio de congelación

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
Medio RPMI 1640		57 ml
Suero fetal bovino	30%	30 ml
L-Glutamina 200 mM	2 mM	1 ml
Hepes 1 M	10 mM	1 ml
Solución Penicilina-Estreptomicina 5000 U/ml-5 mg/ml	50 U/ml y 50 µg/ml	1 ml
DMSO	10%	10 ml

Nota: Tras su preparación alicuota y se conserva a -20°C.

Geles de acrilamida

Reactivo	Volumen reactivos para geles con los siguientes % de acrilamida					
	Gel separador 15%	Gel separador 12%	Gel separador 10%	Gel separador 8%	Gel separador 6%	Gel compactador 4%
Agua bidestilada	1100 µl	1600 µl	1900 µl	2300 µl	2600 µl	3620 µl
Solución acrilamida:bisacrilamida 29:1	2500 µl	2000 µl	1700 µl	1300 µl	1000 µl	650 µl
Tris-HCl 1.5 M pH:8.8	1300 µl	1300 µl	1300 µl	1300 µl	1300 µl	-----
Tris-HCl 1 M pH:6.8	-----	50 µl	-----	-----	-----	
SDS 10% pH:7.2	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
APS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl

Nota: Volúmenes necesarios para la preparación de un gel

Tampón Tris-HCl 1 M pH:6.8

Reactivo	Cantidad reactivo
Trizma Base	121.14 g
HCl	Hasta ajustar pH:6.8
Agua bidestilada	Hasta 1 L

Nota: Disolver el trizma base en agua bidestilada, añadir el HCl hasta ajustar el pH, enrasar con agua bidestilada hasta 1 L y autoclavar.

Tampón Tris-HCl 1.5 M pH:8.8

Reactivo	Cantidad reactivo
Trizma Base	181.71 g
HCl	Hasta ajustar pH:8.8
Agua bidestilada	Hasta 1 L

Nota: Disolver el trizma base en agua bidestilada, añadir el HCl hasta ajustar el pH, enrasar con agua bidestilada hasta 1 L y autoclavar.

SDS 10% pH:7.2

Reactivo	Cantidad reactivo
SDS	181.71 g
NaOH 0.1N	Hasta ajustar pH:7.2
Agua bidestilada	Hasta 1 L

Nota: Disolver el trizma base en agua bidestilada, añadir el HCl hasta ajustar el pH y enrasar con agua bidestilada hasta 1 L.

Tampón de lisis NP-40

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
NP-40	1%	500 µl
Tris-HCl 2 M pH:7.5	10 mM	250 µl
Solución NaCl 5 M	150 mM	1.5 ml
Solución Glicerol 50%	10%	16 ml
Agua bidestilada		Hasta 50 ml

Nota: Tras su preparación alicuota y se conserva a 4°C.

Tampón Tris-HCl 2 M pH:7.5

Reactivo	Cantidad reactivo
Trizma Base	242.28 g
HCl	Hasta ajustar pH:7.5
Agua bidestilada	Hasta 1 L

Nota: Disolver el trizma base en agua bidestilada, añadir el HCl hasta ajustar el pH, enrasar con agua bidestilada hasta 1 L y autoclavar.

Tampón de carga Laemmli (5×)

Reactivo	Concentración final 5×	Volumen reactivo
Tris-HCl 1 M pH:6.8	60 mM	600 µl
Solución Glicerol 50%	25%	5 ml
SDS 10% pH:7.2	2%	2 ml
β-Mercaptoetanol	14.4 mM	500 µl
Solución azul bromofenol 1%	0.1%	1 ml
Agua bidestilada		Hasta 10 ml

Nota: Tras su preparación, se alicuota y se conserva a -20°C.

Tampón Tris-Glicina (5×)

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
Trizma base	125 mM	15.1 g
Glicina	1 M	72 g
SDS 10% pH:7.2	0.5%	50 ml
Agua bidestilada		Hasta 1 L

Tampón de transferencia

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
Trizma base	25 mM	3.03 g
Glicina	192 mM	14.4 g
Metanol	20%	200 ml
Agua bidestilada		Hasta 1 L

Nota: Tras su preparación se conserva a 4°C.

Solución rojo Ponceau (10×)

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
Solución Ponceau 3%	2%	75 ml
Ácido acético	33.3%	37.5 ml

Solución rojo Ponceau (1×)

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
Solución Ponceau 10×	0.2%	5 ml
Ácido acético	10%	3.5 ml
Agua bidestilada		Hasta 50 ml

Tampón de bloqueo (10%)

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
Blocking Reagent	10%	10 g
Tampón maleico		100 ml

Nota: Disolver en agitación y calentando hasta 60-65°C. Tras su preparación, se deja enfriar y se conserva a 4°C.

Tampón de bloqueo (1%)

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
Tampón de bloqueo 10%	1%	50 ml
Solución Tween 20 10%	0.05%	2.5 ml
Tampón Tris 0.05M	0.045 M	447.5 ml

Nota: Tras su preparación se conserva a 4°C.

Tampón maleico pH:7.5

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
Ácido Maleico	100 mM	23.21 g
NaCl	150 mM	17.53 g
NaOH		Hasta ajustar pH:7.5
Agua bidestilada		Hasta 2 L

Tampón Tris 0.05 M

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
Trizma clorhídrico	0.042 M	132 g
Trizma base	0.008 M	19.4 g
Agua bidestilada		Hasta 20 L

Tampón TBS-Tween 20 pH:7.5 (10×)

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
NaCl	1.5 M	80 g
Tris-HCl 1 M pH:7.6	200 mM	200 ml
Tween 20	0.5%	5 ml
Agua bidestilada		Hasta 1 L

Nota: Disolver el NaCl en agua bidestilada, añadir el tampón Tris-HCl 1 M pH:7.6, comprobar que el pH del tampón TBS-Tween 20 queda ajustado a 7.5 y enrasar hasta 1 L con agua bidestilada.

Tampón Tris-HCl 1 M pH:7.6

Reactivo	Cantidad reactivo
Trizma Base	121.14 g
HCl	Hasta ajustar pH:7.6
Agua bidestilada	Hasta 1 L

Nota: Disolver el trizma base en agua bidestilada, añadir el HCl hasta ajustar el pH, enrasar con agua bidestilada hasta 1 L y autoclavar.

Tampón de lisis CHAPS

Reactivo	Concentración final	Volumen reactivo
Solución CHAPS 10%	2%	10 ml
Solución sacarosa 1 M	0.25 mM	12.5 ml
Hepes 1 M	20 mM	1 ml
Solución EDTA 0.5 M	1 mM	500 µl
Solución KCl 1 M	10 mM	500 µl
Solución MgCl ₂ 1 M	1.5 mM	75 µl
Agua bidestilada		Hasta 50 ml

Nota: Tras su preparación alicuota y se conserva a 4°C.

Solución SSC pH:7.0 (20×)

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
NaCl	3 M	175.32 g
Citrato trisódico	0.3 M	88.23 g
HCl		Hasta ajustar pH:7.0
Agua bidestilada		Hasta 1 L

Nota: Nota: Disolver el cloruro sódico y el citrato trisódico en agua bidestilada, añadir el HCl hasta ajustar el pH, enrasar con agua bidestilada hasta 1 L y autoclavar.

Solución (2×)/NP-40 (0.3%)

Reactivo	Concentración final	Cantidad reactivo
Solución SSC 20×	300 mM NaCl 30 mM citrato trisódico	10 ml
NP40	0.3%	300 µl
Agua bidestilada		Hasta 100 ml

Anexo II. Publicaciones

Tipo de publicación: Artículo original

Autores: Castilla C, Flores ML, Conde JM, Torrubia FJ, Japón MA, Sáez C.

Título: Downregulation of protein tyrosine phosphatase PTPL1 alters cell cycle and upregulates invasión-related genes in prostate cáncer cells.

Revista: Clinical & Experimental Metastasis.

Año/Volumen/Páginas: 2012/4/349-358

Factor de impacto (JCR): 3.524

Cuartil: Q2

doi: 10.1007/s10585-012-9455-7

Tipo de publicación: Artículo original

Autores: Flores ML, Castilla C, Ávila R, Ruiz-Borrego M, Sáez C, Japón MA.

Título: Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction.

Revista: Breast Cancer Research and Treatment.

Año/Volumen/Páginas: 2012/133/917-928

Factor de impacto (JCR): 4.431

Cuartil: Q1

doi: 10.1007/s10549-011-1864-9

Tipo de publicación: Artículo original

Autores: Castilla C, Flores ML, Medina R, Pérez-Valderrama B, Romero F, Tortolero M, Japón MA, Sáez C.

Título: Prostate cancer cell response to paclitaxel is affected by abnormally expressed securing PPT1.

Revista: Molecular Cancer Therapeutics.

Año/Volumen/Páginas: 2014/13/2372-2383

Factor de impacto (JCR): 6.107

Cuartil: Q1

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0405

Tipo de publicación: Artículo original

Autores: Flores ML, Castilla C, Gasca J, Medina R, Pérez-Valderrama B, Romero F, Japón MA, Sáez C.

Título: Loss of PKC δ induces prostate cancer resistance to paclitaxel through activation of Wnt/ β -Catenin pathway and Mcl-1 accumulation.

Revista: Molecular Cancer Therapeutics.

Año/Volumen/Páginas: 2016/---/---

Factor de impacto (JCR): 6.107

Cuartil: Q1

doi: ---

