

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Inhibición de HSP90 como nueva estrategia antitumoral contra el cáncer de páncreas exocrino y el cáncer de colon y recto

Leticia Mayor López

Tesis Doctoral

2015

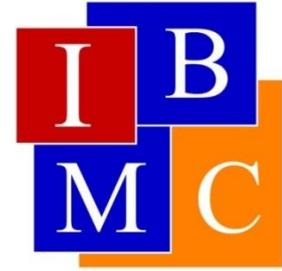
La doctora M^a Isabel Martínez-Lacaci Fortuny, Investigadora de la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y profesora asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA que el presente trabajo de investigación titulado “Inhibición de HSP90 como nueva estrategia antitumoral contra el cáncer de páncreas exocrino y el cáncer de colon y recto” ha sido realizado bajo su dirección por Leticia Mayor López para obtener el grado de Doctora. Una parte de este trabajo se ha desarrollado en el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y otra se ha realizado en la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer ubicada en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de El Palmar (Murcia).

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 16 de Febrero de 2015.

La Directora de la Tesis:

Fdo.: Dra. M^a Isabel Martínez-Lacaci Fortuny



Antonio Ferrer Montiel, director del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral titulada “Inhibición de HSP90 como estrategia terapéutica contra el cáncer de páncreas exocrino y el cáncer de colon y recto”, presentada por doña Leticia Mayor López.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado, en Elche, a 16 de Febrero de 2015.

El Director del Instituto de Biología Molecular y Celular:

Fdo.: Prof. Antonio Ferrer Montiel



"La verdad raramente es pura y nunca es simple"

Oscar Wilde

Agradecimientos

A lo largo de todos estos años, muchas son las personas que han hecho posible que este trabajo se realizara y sin las cuales no hubiera podido llegar hasta aquí. Por todo ello quiero acordarme y mostrar mi gratitud.

En primer lugar quiero darle las gracias a Isabel, mi directora, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo y por enseñarme todo lo relacionado con este fascinante y también difícil mundo de la investigación. Muchísimas gracias.

También quiero agradecer enormemente a todas las personas del IBMC, que me enseñaron todo lo relacionado con un laboratorio de investigación, en especial a Estefanía, Lourdes, Silvina y Ángeles. Gracias a ellas aprendí mucho, al mismo tiempo que me divertía. También a Miguel, Pilar y Pepe por su apoyo y colaboración prestada. Gracias a todos.

Por supuesto, quiero agradecer a todas las personas que han trabajado junto a mí en la Unidad AECC, comenzando por mis compañeras de laboratorio, Elena y Mar, por ayudarme y acompañarme todos los días, además de compartir esta experiencia conmigo. Mil gracias chicas. También quiero acordarme de todas las personas que han estado en el laboratorio conmigo: M^a Ángeles, Nati, Ana,...Gracias por todo. A Carlos, por ayudarme durante todo este tiempo y saber responder a todas mis dudas, muchísimas gracias. También a sus chicas, Lucía y Sofía, por sus sabios consejos. A todo el personal del Biobanco, en especial a Charo, Belén, Agustín, Lidia, Lorena y Encarni, por su apoyo y colaboración durante todo este tiempo, y sobre todo por su compañía. Muchas gracias a todos. A todas las personas que forman parte de otros laboratorios de investigación en la Arrixaca, en especial a Toñi, Laura, Alberto, y Agustín. Gracias por enseñarme nuevas cosas y ayudarme siempre que lo necesité. También me quiero acordar del personal de la FFIS y de la Unidad de Apoyo a la Investigación por su colaboración.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a toda mi familia y en especial a mis padres y hermanos, por ser mi gran apoyo y por creer en mí, y porque sin ellos no hubiera llegado hasta aquí. Quiero dedicarles este trabajo especialmente a mis padres para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Millones de gracias. También quiero darles las gracias a mis amigas, que siempre están conmigo. Quiero acordarme también de mis abuelos y agradecerles por todo. A mi sobrina, por ser la personita más maravillosa de mi vida.

MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO A TODOS.





A mis padres

Resumen

El cáncer de páncreas es un tipo de tumor de baja incidencia, pero la mayoría de pacientes no sobreviven a la enfermedad. En el caso del cáncer colorrectal, hay muchos más pacientes que sobreviven, gracias en parte a la detección temprana, pero su incidencia en la población es muy alta y algunos casos son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad. La búsqueda de nuevas terapias eficaces, capaces de incrementar la supervivencia a estas enfermedades, es un reto de la investigación oncológica.

El uso de la proteína de choque térmico 90 (HSP90) como diana farmacológica ha surgido en los últimos años como una posible terapia antineoplásica prometedora. Esta chaperona está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular, participando en procesos post-traduccionales, como el plegamiento, la translocación o activación de múltiples proteínas conocidas como proteínas "clientes". Muchas de estas proteínas "clientes" son parte clave en el desarrollo, proliferación, invasión y supervivencia de los tumores. Por este motivo, se pensó en el empleo de inhibidores de HSP90 sería una ventajosa estrategia antitumoral, ya que el incorrecto funcionamiento de HSP90 puede alterar simultáneamente numerosas proteínas con un importante función en las células tumorales. En este trabajo, se ha investigado el efecto de dos inhibidores de HSP90 diferentes. Por un lado, hemos estudiado los efectos de un inhibidor de HSP90 de primera generación, llamado 17-AAG o tanespimicina, y por otro, hemos investigado los efectos de un nuevo inhibidor sintético, llamado NVP-AUY922. Ambos tienen un mecanismo de acción común, que consiste en impedir el intercambio ADP/ATP necesario para que HSP90 pueda ejercer su acción, uniéndose de forma potente y selectiva al sitio de unión de ATP. La evaluación de 17-AAG y NVP-AUY922 como agentes antitumorales ha sido realizada en dos modelos celulares de tumores gastrointestinales. Para ello se han utilizado líneas celulares humanas de cáncer de páncreas exocrino y de cáncer colorrectal. Además, se dispuso de cultivos primarios obtenidos de tumores colorrectales extirpados a pacientes. En resumen, los experimentos realizados han mostrado que NVP-AUY922 tiene un potente efecto antitumoral *in vitro*, por encima de los efectos producidos por 17-AAG, en modelos celulares de cáncer de páncreas y de cáncer colorrectal.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. EL CÁNCER EN CIFRAS	7
2. CÁNCER PANCREÁTICO	9
2.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	9
2.2 CARACTERÍSTICAS.....	10
2.3 CLASIFICACIÓN	13
2.4 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CP	15
2.5 TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA	17
3. CÁNCER COLORRECTAL.....	20
3.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	20
3.2 CARACTERÍSTICAS.....	21
3.3 CLASIFICACIÓN	23
3.4 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CCR	26
3.5 TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA	29
4. UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA: HSP90.....	33
4.1 LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)	33
4.2 LA HSP90.....	35
4.3 ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE HSP90	36
4.4 PROTEÍNAS CLIENTES DE HSP90	39
4.5 EL CÁNCER Y LA CHAPERONA HSP90	41
5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y SU RELACIÓN CON HSP90	42
6. LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y LA MUERTE CELULAR EN LAS CÉLULAS TUMORALES.....	46
7. INHIBIDORES DE HSP90.....	50
7.1 INHIBIDORES ANSAMICÍNICOS.....	53
7.1.1 17-AAG	54

7.2 INHIBIDORES DERIVADOS DEL RADICOL	58
7.3 PEQUEÑOS INHIBIDORES SINTÉTICOS	59
7.3.1 NVP-AUY922.....	60
7.4 TERAPIAS COMBINADAS	61
OBJETIVOS.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
1. CULTIVO CELULAR	71
1.1 LÍNEAS CELULARES.....	71
1.2 CONDICIONES DE CULTIVO	72
1.3 CULTIVOS PRIMARIOS	73
1.4 REACTIVOS UTILIZADOS	76
2. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	76
2.1 ENSAYOS DOSIS-RESPUESTA	76
2.2 ENSAYOS DURANTE UN CURSO TEMPORAL.....	78
2.3 ENSAYOS DE COMBINACIÓN DE FÁRMACOS.....	78
2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO.....	80
2.5 ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD	81
3. ESTUDIOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	82
3.1 ANÁLISIS DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR	82
3.2 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H3	84
3.3 SINCRONIZACIÓN CELULAR.....	85
3.4 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR CON ANEXINA V	86
4. ESTUDIOS MEDIANTE MICROSCOPIA	88
4.1 ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA	88
4.2 ESTUDIO DEL ESTADO DE LA CROMATINA.....	90
5. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	90
5.1 EXTRACTOS DE PROTEÍNAS.....	90
5.2 ENSAYO BRADFORD.....	91

5.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT.....	92
5.3.1 Preparación de las muestras para electroforesis.....	92
5.3.2 Electroforesis	92
5.3.3 Transferencia a membrana	93
5.3.4 Bloqueo de la membrana.....	94
5.3.5 Incubación con anticuerpos primarios	95
5.3.6 Incubación con anticuerpos secundarios	95
5.3.7 Inmunodetección.....	96
5.3.8 Reutilización de la membrana.....	97
6. ESTUDIO DEL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS	97
7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	99
8. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO DE GENES MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA	102
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	104
RESULTADOS.....	105
1. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE HSP90	107
2. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE HSP90 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	108
2.1 EFECTOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DEPENDIENTE DE ANCLAJE	108
2.1.1 Efecto antiproliferativo de 17-AAG.....	108
2.1.2 Efecto antiproliferativo de NVP-AUY922	111
2.1.3 Efectos antiproliferativos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre cultivos primarios	114
2.1.4 Efectos antiproliferativos durante un curso temporal	117
2.2 EFECTOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDEPENDIENTE DE ANCLAJE	119
2.2.1 Efectos de 17-AAG sobre la formación de colonias	119
2.2.2 Efectos de NVP-AUY922 sobre la formación de colonias	120
2.2.3 Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la formación de colonias en cultivos primarios.....	122

3. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE HSP90 SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CLIENTES O SUS DIANAS RELACIONADAS CON LAS RUTAS PI3-K/AKT Y MAPK	124
3.1 EFECTOS DE 17-AAG SOBRE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON HSP90	124
3.2 EFECTOS DE NVP-AUY922 SOBRE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON HSP90	126
3.3 EFECTOS DE 17-AAG Y NVP-AUY922 EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON HSP90 A TIEMPOS CORTOS	127
3.4 EFECTOS EN LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN EN DIFERENTES QUINASAS TRAS EL TRATAMIENTO CON 17-AAG Y NVP-AUY922	128
3.5 EFECTOS DE 17-AAG Y NVP-AUY922 SOBRE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON HSP90 EN CULTIVOS PRIMARIOS	131
4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE HSP90 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR	133
4.1 EFECTOS DE 17-AAG SOBRE EL CICLO CELULAR EN LÍNEAS CELULARES	133
4.1.1 Efectos de 17-AAG sobre el ciclo celular en líneas celulares de CP	133
4.1.2 Efectos de 17-AAG sobre el ciclo celular en las líneas celulares de CCR	136
4.2 EFECTOS DE NVP-AUY922 SOBRE EL CICLO CELULAR EN LÍNEAS CELULARES	139
4.2.1 Efectos de NVP-AUY922 sobre el ciclo celular en las líneas celulares de CP	139
4.2.2 Efectos de NVP-AUY922 sobre el ciclo celular en las líneas celulares de CCR	141
4.3 EFECTOS DE 17-AAG Y NVP-AUY922 SOBRE EL CICLO CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS	143
5. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE LAS CÉLULAS EN LA FASE G ₂ /M DEL CICLO CELULAR PRODUCIDA POR 17-AAG Y NVP-AUY922	145
5.1 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H3 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	145
.....	148
5.2 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H3 MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	148
5.3 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE NVP-AUY922 EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL AVANCE DE LAS CÉLULAS DE LA FASE G ₂ HACIA LA FASE M.....	153

5.4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE NVP-AUY922 SOBRE LA FASE G ₂ /M EN CÉLULAS SINCRONIZADAS	157
6. ESTUDIO DEL INCREMENTO DE LA FASE SUBG ₁ PRODUCIDA POR 17-AAG Y NVP-AUY922	159
6.1 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR PRODUCIDA POR 17-AAG	160
6.2 ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR PRODUCIDA POR NVP-AUY922	162
7. ESTUDIO DE FACTORES RELACIONADOS CON LA ACCIÓN ANTITUMORAL DE 17-AAG	164
7.1 PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES ABC	164
7.2 PAPEL DE LA ENZIMA NQO1	166
7.2.1 Estudio de la expresión y la actividad enzimática de NQO1	167
7.2.2 Inhibición farmacológica de NQO1	170
7.2.3 Inhibición biológica de NQO1	173
8. ESTUDIO DE LA COMBINACIÓN DEL INHIBIDOR NVP-AUY922 CON OTROS FÁRMACOS ANTITUMORALES	175
DISCUSIÓN	181
1. IMPLICACIONES DE LA INHIBICIÓN DE HSP90 EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR	184
2. ALTERACIÓN EN LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN PI3-K Y MAPK POR LA INHIBICIÓN DE HSP90	189
3. EFECTOS SOBRE EL CICLO CELULAR Y MUERTE CELULAR PRODUCIDOS POR LA INHIBICIÓN DE HSP90	196
4. LIMITACIONES DE 17-AAG COMO INHIBIDOR DE HSP90	205
5. LA INHIBICIÓN DE HSP90 EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS ANTITUMORALES	211
CONCLUSIONES	217
BIBLIOGRAFÍA	223

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estimación del número de casos de incidencia (barra azul) y mortalidad (barra roja) mundial para ambos sexos y todas las edades para 2012	7
Figura 2: Estimación del número de casos y su porcentaje de la incidencia de cáncer en España para ambos sexos y todas las edades para 2012.....	8
Figura 3: Imagen del estadio III en el CP	15
Figura 4: Modelo de progresión del cáncer de páncreas, mostrando las alteraciones genéticas que pueden producirse durante su desarrollo.	16
Figura 5: Imagen del estadio IIA, IIB y IIC del CCR.....	25
Figura 6: Modelo característico de tumorigénesis en el CCR	27
Figura 7: Representación de los subtipos moleculares de CCR	28
Figura 8: Esquemática representación de los dominios de HSP90.....	36
Figura 9: Modelo esquemático de la maquinaria multi-chaperona de HSP90 en el complejo maduro e intermedio	39
Figura 10: Representación esquemática de las modificaciones post-traduccionales en las que participa HSP90 cuando se une a una proteína cliente.	40
Figura 11: Representación de HSP90 en células sanas y transformadas	42
Figura 12: Descripción de las rutas de señalización PI3-K/Akt y MAPK, indicando varios de sus integrantes	45
Figura 13: Representación esquemática del ciclo celular de células humanas, con los puntos de parada o control, así como los principales complejos ciclina-Cdk formados en las fases del ciclo celular	47
Figura 14: Representación gráfica de algunos tipos de muerte celular	50
Figura 15: Estructura química de GA y varios de sus derivados ansamicínicos	54
Figura 16: Equilibrio dinámico redox entre 17-AAG y su forma hidroquinona (17-AAGH ₂), y la formación de IPI-504.....	57
Figura 17: Estructura química de radicol.....	58
Figura 18: Estructura química de NVP-AUY922.	61
Figura 19: Procedimiento del ensayo en agar blando para determinar la formación de colonias y su tinción con INTZ	81
Figura 20: Perfil de ciclo celular obtenido mediante marcaje de ADN con yoduro de propidio por citometría de flujo.	83
Figura 21: Gráfico que muestra la distribución de las células según su marcaje con FITC-Anexina V y 7-AAD.....	87
Figura 22: Sándwich de transferencia	94
Figura 23: Esquema ilustrativo del kit Human Phospho-MAPK Array	98

Figura 24: Reducción del compuesto DCPIP.	100
Figura 25: Secuencia del ARNi de NQO1 (Silencer® Select Validado siRNA, Ambion®) utilizado en los ensayos de silenciamiento.....	103
Figura 26: Expresión de HSP90 en las líneas celulares de CP y CCR	107
Figura 27: Densitometrado de la expresión de HSP90 en las líneas celulares de CP. ...	107
Figura 28: Densitometrado de la expresión de HSP90 en las líneas celulares de CCR ..	108
Figura 29: Efecto de 17-AAG sobre la proliferación celular en las líneas celulares de CP.	109
Figura 30: Efecto de 17-AAG sobre la proliferación celular en líneas celulares de CCR	110
Figura 31: Efecto de NVP-AUY922 sobre la proliferación celular en líneas celulares de CP.	112
Figura 32: Efecto de NVP-AUY922 sobre la proliferación celular en líneas celulares de CCR.....	113
Figura 33: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la proliferación celular de cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes con CCR.	115
Figura 34: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la proliferación celular en cuatro cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes con CCR: HCUVA-CC-1 (CC-1), HCUVA-CC-34 (CC-34), HCUVA-CC-1 ^{CT} (CC-1 ^{CT}) y HCUVA-CC-3 ^{CT} (CC-3 ^{CT})	116
Figura 35: Curso temporal de la proliferación celular tras el tratamiento de inhibidores de HSP90.....	118
Figura 36: Número de colonias formadas por varias líneas celulares	119
Figura 37: Efecto de 17-AAG en la formación de colonias en líneas celulares	120
Figura 38: Efecto de NVP-AUY922 en la formación de colonias en líneas celulares.....	121
Figura 39: Imágenes escaneadas de las colonias formadas por las líneas IMIM-PC-1 y PANC-1 tratadas con 17-AAG y NVP-AUY922.....	121
Figura 40: Número de colonias formadas por cultivos primarios.....	122
Figura 41: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 en la formación de colonias de cultivos primarios.....	123
Figura 42: Imágenes escaneadas de las colonias formadas por cultivos primarios.....	123
Figura 43: Efectos de 17-AAG sobre los niveles de expresión en proteínas relacionadas con HSP90.....	125
Figura 44: Efectos de NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90.....	126
Figura 45: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90 a tiempos cortos.....	128
Figura 46: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles relativos de fosforilación de proteínas relacionadas con las rutas PI3-K/Akt y MAPK	129

Figura 47: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de fosforilación de RPS6	130
Figura 48: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90 en cultivos primarios	132
Figura 49: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CP	134
Figura 50: Efecto de 17-AAG sobre los niveles de ciclina D1 en la línea celular de CP IMIM-PC-2.....	135
Figura 51: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CCR.....	137
Figura 52: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CP	140
Figura 53: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CCR.....	142
Figura 54: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes de CCR.....	144
Figura 55: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la fosforilación (Ser28) de la histona H3	147
Figura 56: Histogramas del ciclo celular e histona H3 fosforilada (Ser28) tras el tratamiento con NVP-AUY922.....	148
Figura 57: Figuras mitóticas formadas en una línea celular tras el efecto de 17-AAG y NVP-AUY922.....	150
Figura 58: Análisis por microscopía confocal de fluorescencia del efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 en líneas celulares de CP, de CCR y cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes	153
Figura 59: Efecto del inhibidor NVP-AUY922 sobre las proteínas relacionadas con la transición G2/M del ciclo celular.....	154
Figura 60: Densitometrado de los niveles de fosfo-Cdc2 (Tyr15) y Cdc2 tras el tratamiento con el inhibidor NVP-AUY922.....	155
Figura 61: Efecto del inhibidor NVP-AUY922 sobre las proteínas relacionadas con la transición G2/M del ciclo celular en cultivos primarios.....	156
Figura 62: Efectos de NVP-AUY922 sobre las fases del ciclo celular en la línea celular de CP CFPAC-1 tras su sincronización	157
Figura 63: Efecto de NVP-AUY922 sobre los niveles totales de Cdc2 y su forma fosforilada en la línea celular de CP CFPAC-1 tras ser sincronizada.....	158
Figura 64: Porcentaje de células IMIM-PC-2 marcadas con Anexina V y/o 7-AAD tras el tratamiento con 17-AAG.....	160
Figura 65: Estudio mediante microscopía de fluorescencia del efecto de 17-AAG sobre la integridad de la cromatina.....	161

Figura 66: Porcentaje de células IMIM-PC-2 y CFPAC-1 marcadas con Anexina V y/o 7-AAD tras el tratamiento con NVP-AUY922.....	162
Figura 67: Estudio mediante microscopía de fluorescencia del efecto de NVP-AUY922 sobre la integridad de la cromatina.	163
Figura 68: Niveles de expresión de los transportadores ABC	165
Figura 69: Densitometrado de los niveles de los transportadores ABC	166
Figura 70: Niveles de expresión de la enzima NQO1.....	167
Figura 71: Relación entre la IC ₅₀ de 17-AAG y NVP-AUY922 con la actividad enzimática de NQO1	169
Figura 72: Inhibición de la proliferación producida por 17-AAG y ES 936.....	171
Figura 73: Inhibición de la formación de colonias producida por 17-AAG y ES 936 en ensayos de clonogenicidad.....	172
Figura 74: Inhibición biológica de la enzima NQO1.....	174
Figura 75: Efectos combinatorios de NVP-AUY922 con otros fármacos	178

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación TNM y estadificación clínica para el CP (6ª edición)	14
Tabla 2: Clasificación TNM y estadificación clínica del CCR (7ª edición).....	24
Tabla 3: Componentes generales que participan en la maquinaria multi-chaperona de HSP90.....	38
Tabla 4: Clasificación de algunos de los inhibidores de HSP90 más destacados.	52
Tabla 5: Nombre y descripción de las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino (CP)	71
Tabla 6: Nombre y origen de las líneas celulares de CCR.....	72
Tabla 7: Nombre y origen de otras líneas celulares utilizadas como controles positivos	72
Tabla 8: Nomenclatura y procedencia de los cultivos primarios estudiados.	74
Tabla 9: Características y abreviatura (Abre.) de algunas de las muestras tumorales donadas por los pacientes con CCR a partir de las que se han obtenido los cultivos primarios.....	74
Tabla 10: Descripción de los reactivos utilizados.....	76
Tabla 11: Nombre y diluciones de los anticuerpos y fluorocromos empleados para ensayos de inmunotinción.....	89
Tabla 12: Componentes de los geles de electroforesis y concentraciones de los mismos	93
Tabla 13: Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.....	95

Tabla 14: Nombre y sitio de fosforilación de las proteínas estudiadas y detectadas en la membrana del kit Human Phospho-MAPK Array	98
Tabla 15: Volumen de los reactivos empleados en el ensayo de actividad enzimática	101
Tabla 16: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CP y su valor de IC ₅₀	110
Tabla 17: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CCR y su valor de IC ₅₀	111
Tabla 18: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CP y su valor de IC ₅₀	112
Tabla 19: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CCR y su valor de IC ₅₀	114
Tabla 20: Porcentaje de inhibición de cultivos primarios y su valor de IC ₅₀	117
Tabla 21: Porcentaje de inhibición de ocho líneas celulares tras el tratamiento de 17-AAG y NVP-AUY922 durante 6 días	118
Tabla 22: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas celulares de CP tratadas con DMSO (control) y tratadas con 0,5 μM de 17-AAG durante 24, 48 o 72h	136
Tabla 23: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas celulares de CCR tratadas con DMSO (control) o 0,5 μM de 17-AAG durante 24, 48 o 72h	138
Tabla 24: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas celulares de CP tratadas con DMSO (control) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (NVP) durante 24, 48 o 72h	141
Tabla 25: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas de CCR tratadas con DMSO (control) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (NVP) durante 24, 48 o 72h	143
Tabla 26: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en los cultivos CC-1 y CC-3 ^{CT} tratados con DMSO (control) o 0,5μM de 17-AAG o 0,1 μM de NVP-AUY922, durante 24h	145
Tabla 27: Valores promedio (n≥3) y SEM del porcentaje de células positivas para fosfo-histona H3 (Ser 28) en la fase G ₂ /M del ciclo celular, determinadas mediante citometría de flujo.....	147
Tabla 28: Porcentaje de núcleos positivos para fosfo-histona H3 (Ser10).....	149
Tabla 29: Valores de los niveles de fosfo-Cdc2 (Tyr15) y Cdc2 tras el tratamiento con el inhibidor NVP-AUY922	155
Tabla 30: Actividad de NQO1 en las líneas celulares de CP y CCR	168
Tabla 31: Actividad de NQO1 tras 4 horas de tratamiento con ES 936.....	172
Tabla 32: Actividad de NQO1 tras el silenciamiento biológico de NQO1.....	175
Tabla 33: Porcentaje de inhibición de la proliferación tras el tratamiento de NVP-AUY922 en combinación con otros fármacos.....	177

Abreviaturas y Acrónimos

- 5FU:** fármaco antineoplásico análogo del uracilo llamado 5-Fluorouracilo.
- 5FU/LV:** combinación de los fármacos 5FU/leucovorina.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- AHA1:** activador de HSP90 ATPasa homólogo 1.
- Akt (PKB):** proteína quinasa B.
- ALK:** gen que codifica una proteína llamada quinasa de linfoma anaplásico.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.
- APC:** gen supresor de tumores (*Adenomatous polyposis coli*) que codifica la proteína de igual nombre.
- ATCC:** *American Type Culture Collection*.
- ATP/ADP:** adenosina trifosfato/difosfato.
- ATPasa:** adenilpirofosfatasa.
- Bcl-2:** familia de proteínas cuyo nombre proviene de su primer miembro *B-cell lymphoma 2*.
- BCRP (ABCG2):** proteína de resistencia del cáncer de mama.
- BD:** *Becton, Dickinson and Company*.
- BRAF:** gen homólogo del oncogén de sarcoma murino viral B.
- B-Raf:** proteína quinasa perteneciente a la familia Raf codificada por BRAF.
- BRCA1:** proteína susceptible de cáncer de mama tipo 1.
- BRCA2:** proteína susceptible de cáncer de mama tipo 2.
- BSA:** albúmina de suero bovino.
- CA 19.9:** antígeno carbohidratado.
- CCR:** cáncer colorrectal.
- ciclina B1:** ciclina reguladora del ciclo celular.
- Cdc2 (Cdk1):** quinasa dependiente de ciclina 1.
- Cdc25C:** proteína fosfatasa que participa en la regulación del ciclo celular.
- Cdk:** quinasa dependiente de ciclina.
- Cdk4 /Cdk6 / Cdk2:** quinasa dependiente de ciclina 4, o 6, o 2.
- CDKN2A:** gen que codifica dos proteínas, p16 y p14^{ARF}, que participan en la proliferación celular.
- CEA:** antígeno carcinoembrionario.
- CHIP:** proteína ubiquitina ligasa E3.
- CIN:** inestabilidad cromosómica.
- CP:** cáncer pancreático.
- CPF:** cáncer pancreático familiar.
- CRM:** margen lateral o circunferencial de un tumor.
- DCBE:** doble contraste con enema de bario.
- DMEM:** medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's*.

DMEM/ Ham's F12: medio de cultivo DMEM con la mezcla de nutrientes Ham's F12.

DMSO: dimetil sulfóxido.

E2F: factor de transcripción que participa en la progresión del ciclo celular.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR (HER-1): Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ERK (MAKP1): del inglés *Extracellular signal-Regulated kinase*.

ETM: escisión total del mesorecto.

FAD/FADH₂: dinucleótido de flavina y de adenina.

FAP: Poliposis adenomatosa familiar.

FBDD: *Fragment-based drug design*.

FDA: *Food and Drug Administration*.

FITC: Isotioisocianato de fluoresceína.

FOLFIRI: Combinación de Irinotecan/5FU/LV.

FOLFOX: combinación de los fármacos 5FU/LV/OXA.

FOLFIRINOX: combinación de fármacos 5FU/LV/Irinotecan/OXA.

GA: fármaco derivado ansamicínico llamado Geldanamicina.

GAPs: proteínas activadoras de GTPasas.

GEM: Fármaco antineoplásico análogo de la citosina llamado Gemcitabina.

Grb2: proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2.

GRP94: proteína regulada por glucosa 94.

GSH: glutatión.

GTP/GDP: guanosin trifosfato/difosfato.

HBOC: síndrome hereditario del cáncer de mama-ovario.

HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico.

HER2 (Neu/ErbB2): receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2.

HER3 (ErbB3): receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 3.

HER4 (ErbB4): receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 4.

HGUE: Hospital General Universitario de Elche.

HIF-1: factor de hipoxia inducible 1.

HIP y HOP: proteínas adaptadoras que interaccionan con HSP70 y HSP90.

HRAS: gen homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Harvey.

H-Ras: proteína GTPasa de la familia Ras codificada por el oncogén HRAS.

HSF-1: factor de choque térmico 1.

HSP90 y HSP70: proteínas de choque térmico.

hTERT: subunidad catalítica de la telomerasa, llamaba telomerasa transcriptasa inversa humana.

HUSL: Hospital Universitario Santa Lucía, Cartagena, Murcia.

IC₅₀: concentración de un fármaco que inhibe el 50% del crecimiento celular.

IGF1R: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1.

IMIM: Institut Municipal d'Investigació Mèdica.

IPMN: neoplasma mucinosa papilar intraductal.

KDa: Kilodalton.

KRAS: gen homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten.

K-Ras: proteína GTPasa de la familia Ras codificada por el oncogén KRAS.

LV: fármaco compuesto por tetrahidrofolatos llamado leucovorina o ácido folínico.

MAPK: del inglés *Mitogen-activated protein kinases*.

MCP: muerte celular programada.

MDRs: mecanismos de resistencia a fármacos.

Mdr-1 (P-gp/ABCB1): proteína resistente a múltiples fármacos o glicoproteína P.

Mek 1/2: del inglés *Mitogen/Extracellular signal-regulated kinase*.

MET: resección microquirúrgica endoscópica transanal.

MCN: Neoplasma quística mucinosa.

MMP2: enzima de la familia de las metaloproteinasas de matriz que degrada el colágeno de tipo IV.

MMR: desajuste del sistema de reparación del ADN.

MPF: factor de iniciación de la mitosis.

MRP1 (ABCC1): proteína de resistencia a múltiples fármacos 1.

MSI: inestabilidad de microsatélites.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio.

Myt-1: tirosina/treonina quinasa asociada a la membrana inhibidora específica de Cdc2.

mTOR: diana de la Rapamicina en células de mamíferos.

NAD/NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina.

NADP/NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamina y de adenina.

NQO1: NAD(P)H:quinona oxidorreductasa 1.

NRAS: gen homólogo del oncogén viral de neuroblastoma Ras.

N-Ras: proteína GTPasa de la familia Ras codificada por el oncogén NRAS.

NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OXA: fármaco antineoplásico alquilante de ADN llamado Oxaliplatino.

p50/Cdc37: co-chaperona de HSP90.

p70S6K: proteína ribosomal S6 quinasa beta-1.

PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática.

PARP: enzima poli ADP ribosa polimerasa.

PBS: tampón fosfato salino.

PDAC: adenocarcinoma pancreático ductal.

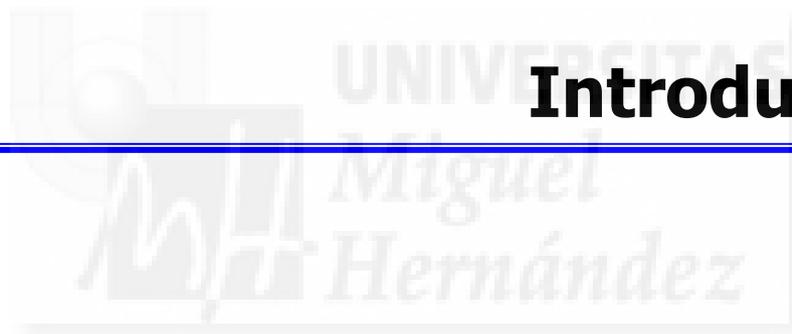
PDK-1 y PDK-2: quinasas dependientes de fosfatidilinositoles.

PI3-K: fosfatidilinositol 3-quinasa.

PIK3CA: gen que codifica la proteína PI3-K.

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.
Plk1: proteína quinasa reguladora del ciclo celular.
PPoma: tumor secretor de polipéptido pancreático.
PS: fosfatidilserina.
PSA: persulfato amónico.
Raf-1 (c-Raf): proteína quinasa perteneciente a la familia Raf.
Rb: proteína del Retinoblastoma.
RPMI: medio de cultivo desarrollado en el *Roswell Park Memorial Institute*.
RPS6: proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S.
RSK1 (p90S6K): proteína ribosomal S6 quinasa alfa-1.
RTK: Receptor tirosina quinasa.
Rb: proteína de retinoblastoma.
SBF: suero bovino fetal.
SEM: error estándar de la media.
SCN: cistadenoma seroso
SDS: sulfato de dodecil.
SF: sigmoidoscopia flexible.
SMAD4: gen que codifica proteínas que participan en la señalización celular.
SOS: intercambiador de nucleósidos de guanina.
SPN: neoplasia sólida pseudopapilar.
Src: proteína tirosina quinasa no receptora codificada por el oncogén SRC.
TRAP1: receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1.
TBS: tampón Tris salino.
TC: tomografía computarizada.
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletileno diamina.
TGF- α : factor de crecimiento transformante alfa.
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.
TNF: factor de necrosis tumoral.
TP53: gen supresor de tumores p53.
transportadores ABC: transportadores de membrana dependientes de ATP.
UFT/LV: combinación de tegafur (UFT), un pro-fármaco oral de 5FU con LV.
UICC: Unión Internacional contra el Cáncer.
USE: ultrasonografía endoscópica.
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.
VIPoma: tumor secretor del polipéptido intestinal vasoactivo.
Wee1: quinasa de la familia WEE que participa en la regulación del ciclo celular.
YP: yoduro de propidio.

Introducción



1. El cáncer en cifras

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el desarrollo descontrolado de células que modifican sus características primitivas, adquiriendo unas nuevas que les confieren malignidad, que es variable para cada tipo de neoplasia. En general, las células cancerosas se dividen sin control y de manera autónoma, aumentando su número considerablemente llegando a reemplazar y/o destruir los órganos y tejidos sanos que las rodean. Al inicio de la enfermedad, el tumor se encuentra localizado donde se ha generado (lesión primaria), pero la mayoría son capaces de invadir los tejidos adyacentes. Además, las células cancerígenas pueden diseminarse a través de los ganglios linfáticos o los vasos sanguíneos y colonizar otros órganos y/o tejidos alejados de su punto de origen, produciendo nuevos tumores a distancia (metástasis). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la causa más importante de muerte y morbilidad en Europa, después de las enfermedades cardiovasculares.

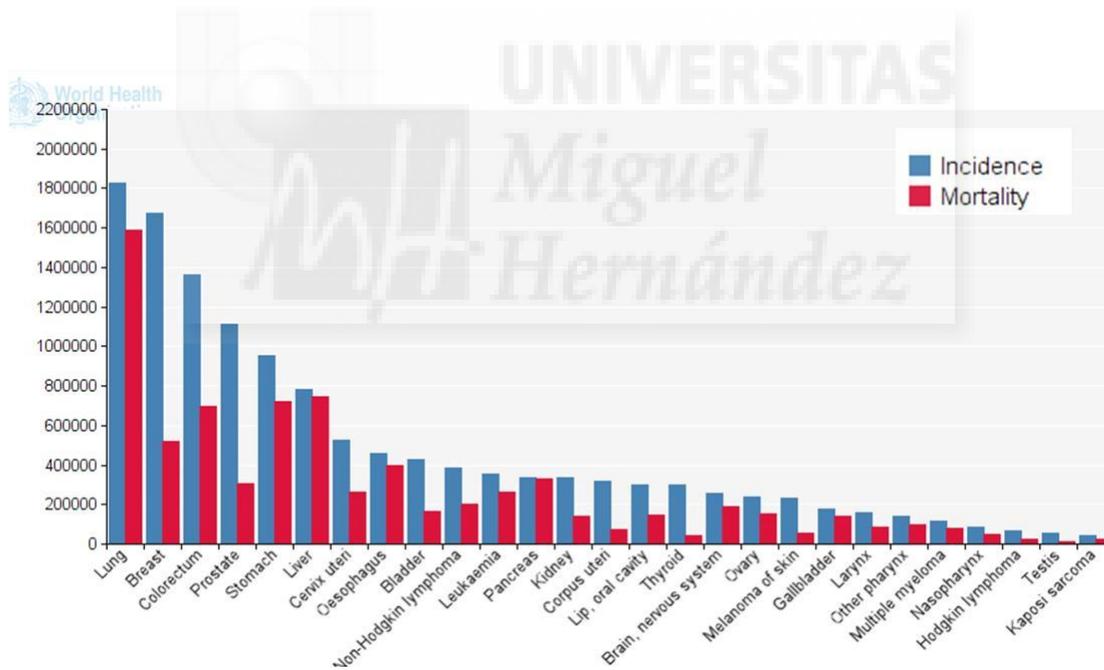


Figura 1: Estimación del número de casos de incidencia (barra azul) y mortalidad (barra roja) mundial para ambos sexos y todas las edades para 2012 (tomado de <http://globocan.iarc.fr>).

A nivel mundial, hubo 14,1 millones de casos nuevos de cáncer, 8,2 millones de muertes producidas por cáncer y 32,6 millones de personas diagnosticadas con cáncer (en los 5 primeros años) en el año 2012 [1], lo que representa un problema sanitario y social muy importante en la actualidad. El cáncer con mayor número de casos para

Introducción

ambos sexos es el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de mama y el cáncer colorrectal (CCR) (Figura 1).

En España, desde el comienzo del siglo XIX los tumores malignos son la principal causa de muerte en varones, y la segunda en mujeres. Aun así, las tasas de mortalidad debida a un cáncer han estado disminuyendo desde la década de los 90 en los países desarrollados, no así el número de casos nuevos que aparecen cada año [2]. Según los datos del programa GLOBOCAN 2012, la estimación de la incidencia de cáncer en España superó los 200.000 casos, dentro de los cuales el CCR representa el cáncer con más casos en nuestro país para ambos sexos, con una incidencia del 15% (Figura 2). Si tenemos en cuenta la mortalidad en nuestro país, el cáncer de pulmón es el cáncer que más muertes causa con un 20% de las muertes producidas, seguido del CCR con un 14% [1].

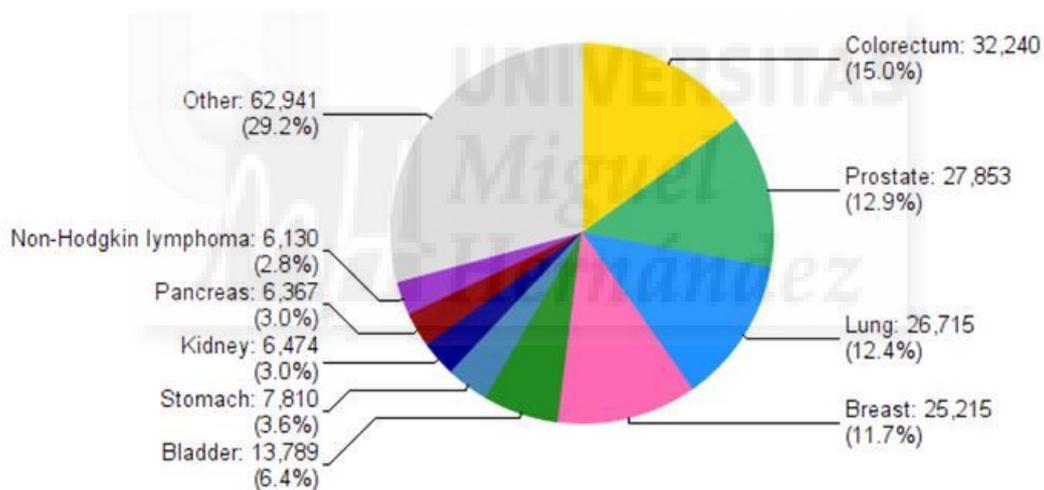


Figura 2: Estimación del número de casos y su porcentaje de la incidencia de cáncer en España para ambos sexos y todas las edades para 2012 (tomado de <http://globocan.iarc.fr>).

Además la prevalencia para 1, 3 y 5 años (excluyendo los casos de cáncer de piel no melanocítico) nos dice que el número de casos irá en aumento, muy probablemente debido al envejecimiento de la población, estando por encima de los 500.000 casos para 2017 [3].

El proyecto "Eurocare: Cancer Survival in Europe" recoge información epidemiológica sobre la supervivencia de los pacientes con cáncer de 23 países europeos y ha recopilado más de 13 millones de casos entre 1978 y 2002. Este proyecto

se creó para analizar las tendencias de supervivencia y estudiar las diferencias entre países europeos. A pesar de que todos los datos indican que el número de pacientes de cáncer será mayor en el futuro, el último informe publicado por este proyecto, Eurocare-4, donde se analizaron los datos de pacientes diagnosticados en Europa entre los años 1995-1999 con información vital hasta el año 2003, indica que se producirá una mejora en la supervivencia para la mayoría de los tumores, tanto en España como en Europa. El cáncer que muestra la peor tasa de supervivencia para 5 años es el cáncer pancreático (CP) [4, 5].

Probablemente sea el envejecimiento de la población la mayor causa del aumento de la incidencia en cáncer, pero afortunadamente también cada vez hay más pacientes que sobreviven a él, gracias a la aparición de nuevas terapias más eficaces, sistemas de cribado y actividades para la detección precoz, junto a mejores sistemas de diagnóstico.

Todos estos datos nos ofrecen una idea de la importancia de esta enfermedad a nivel global hoy día, y la relevancia de su estudio, tanto en prevención, dado que su detección temprana aumenta sustancialmente la probabilidad de curación, como en el desarrollo de nuevas terapias capaces de controlarla y curarla.

2. Cáncer pancreático

2.1 Epidemiología

El cáncer pancreático (CP) es un tumor con una baja incidencia en comparación con el cáncer de pulmón o de mama, pero aun así es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, siendo la quinta causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres, en la región europea [1]. El periodo de edad donde más pacientes son diagnosticados está comprendido entre los 65-75 años [6-8], aunque puede aparecer a cualquier edad.

En España, fue en los años 80 cuando la tasa de mortalidad sufrió el mayor aumento, y a partir de esta década, el número de muertes ha crecido paulatinamente y se ha mantenido estable hasta la actualidad, probablemente consecuencia de las mejoras en las técnicas de diagnóstico llevadas a cabo en los últimos años [2]. Para el

Introducción

año 2012, se estima que fue la cuarta causa muerte por cáncer en nuestro país para ambos sexos [1].

Hay que puntualizar que otros tipos de tumores causan un mayor número de muertes que el CP, pero lo grave de este tumor es que el número de pacientes afectados y el número de muertes son prácticamente iguales a nivel mundial, es decir, que casi ningún paciente sobrevive a esta enfermedad.

Esto se debe principalmente a que es una de las neoplasias con mayor malignidad, teniendo una tasa de supervivencia global a 5 años inferior al 5% [9]. Esta baja tasa de supervivencia viene agravada por el hecho de que su diagnóstico normalmente se produce en etapas muy avanzadas de la enfermedad, por lo que la mayoría de los pacientes tienen un pronóstico bastante malo cuando la enfermedad es detectada. Según la Sociedad Americana del Cáncer, en el periodo 2003-2009 sólo el 9% de los tumores pancreáticos eran diagnosticados cuando el tumor está localizado [10], es decir, todavía no se había diseminado.

De hecho, el momento en el que se diagnostica es muy importante, ya que de ello depende que se pueda aplicar un tratamiento quirúrgico, que es, de momento, la única posibilidad de curación. Si la operación se realiza en las primeras etapas de la enfermedad, la supervivencia estimada ronda los 24 meses, pero por el contrario, si el paciente ya se encuentra en un estadio avanzado de la enfermedad, el tiempo se reduce a 4,5 meses [7]. Por desgracia, algunos estudios nos indican que sólo entre un 10%-25% de los pacientes se les puede realizar la resección tumoral [8, 11]. El resto, no puede someterse al tratamiento quirúrgico y su tiempo medio de supervivencia, independientemente del estadio en el que se encuentra la enfermedad, es solamente de 3,5 meses.

2.2 Características

Los tumores pancreáticos epiteliales son lesiones producidas por células cancerígenas localizadas en la parte exocrina del páncreas, formada por células acinares, centroacinosas y ductales, o en la parte endocrina, formada por las células llamadas islotes de Langerhans. Menos frecuentes son los tumores de origen no

epitelial, como sarcomas o linfomas. Nosotros nos vamos a centrar en los tumores epiteliales.

La parte exocrina del páncreas es la encargada de segregar las enzimas digestivas, y las lesiones tumorales presentes en esta parte constituyen la mayoría de los tumores pancreáticos. La neoplasia más frecuente, entre el 85% y el 90% de los casos, es el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC). Por ello, normalmente cuando se habla de CP, y concretamente en nuestro trabajo, se viene a referir a este tipo de lesión. El resto, menos de un 5%, son neoplasias endocrinas, también llamadas tumores neuroendocrinos o de las células de los islotes. Este subtipo de tumores pancreáticos forma un grupo muy heterogéneo y poco frecuente. Normalmente se dividen entre los tumores capaces de liberar hormonas peptídicas pancreáticas, como la insulina o el glucagón, por lo que son conocidos como *funcionales*, y los *no funcionales*. Estos últimos son capaces de secretar hormonas, pero su respuesta clínica no está relacionada con la secreción hormonal.

Dentro de los *funcionales*, cuyos síntomas están causados por la hiperproducción hormonal, encontramos el insulinoma, glucagonoma, somatitoma, gastrinoma (común en los pacientes con síndrome de Zollinger-Ellison), o el tumor secretor del polipéptido intestinal vasoactivo (VIPoma, o también llamado síndrome de Verner-Morrison), entre otros. De los *no funcionales* hay que destacar que se caracterizan por mostrar un comportamiento maligno, con invasión de tejidos adyacentes o metástasis, y por tener un gran tamaño, lo que facilita su detección y causa dolor en el paciente [12]. La neoplasia no funcional más frecuente es el tumor secretor de polipéptido pancreático (PPoma).

Anatómicamente, el páncreas se divide en varias secciones. El extremo ancho se llama cabeza, en la parte media está el cuello y el cuerpo, y el extremo delgado es la cola. Los tumores pancreáticos se localizan frecuentemente en la cabeza de la glándula (75%), seguidos por los que se encuentran en el cuerpo y la cola (25%) [7, 11], y se caracterizan por diseminarse a distancia con facilidad, invadiendo los vasos linfáticos y los tejidos pancreáticos contiguos. Además, son capaces de alcanzar rápidamente el hígado a través de la circulación portal.

Introducción

Desde el punto de vista clínico, son tumores asintomáticos hasta estadios muy avanzados de la enfermedad, dificultando su diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad, lo que empeora el pronóstico de los pacientes, como ya hemos comentado. Algunos síntomas que a menudo pueden asociarse a este tipo de tumores son ictericia, dolor abdominal o de espalda, pérdida de peso inexplicable y anorexia.

Etiológicamente hablando, la mayoría de los CP son esporádicos, y el factor de riesgo más importante asociado a ellos es el tabaco. Algunos estudios han estimado que entre 20-30% de los casos de CP son consecuencia del consumo de tabaco [13]. Otros factores como la edad, la obesidad, diabetes, e incluso la pancreatitis crónica previa se han relacionado con estas neoplasias, aunque la relación entre estos factores y el CP no está claramente establecida en todos los casos. Pero no todos los CP surgen de forma esporádica, ya que existen aproximadamente un 10% que están relacionados con factores genéticos hereditarios que predisponen a la enfermedad. Por el momento se desconocen cuáles son los factores genéticos, o los genes concretos, que juegan un papel importante de la predisposición hereditaria al CP, por lo que no existen pruebas diagnósticas concluyentes para saber si un familiar u otra persona tienen más riesgo de sufrir CP. En los últimos estudios se han encontrado mutaciones de línea germinal asociadas a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [14], aunque estas mutaciones no se producen en todos los casos, y por tanto, todavía no existe una correlación genética correcta. Por ejemplo, el gen supresor BRCA2 presentó mutaciones germinales en un 19% de las familias con cáncer de páncreas familiar (CPF) incluidas en un estudio realizado en Europa [15], y es el candidato con mayor relación para este tumor. Sin embargo, en el resto de las familias estudiadas, un 80%, no se encuentra mutado.

Se considera CPF cuando en una familia, o al menos dos de sus miembros directos, sufren CP sin estar asociado a un síndrome identificable. De hecho, cuando dos o más individuos de primer grado de la misma familia están afectados por la enfermedad, el riesgo de padecer esta enfermedad con respecto a la población aumenta casi 7 veces para el resto de los familiares, y si son tres individuos los afectados en la misma familia, el riesgo es 36 veces mayor [13]. Existen síndromes hereditarios de cáncer que también pueden predisponer a sufrir CP. Entre ellos vamos a

nombrar el cáncer familiar de mama y ovario hereditario (HBOC), que suele ser debido a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, o síndromes relacionados con el CCR hereditario como son el síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar (FAP). Síndromes hereditarios que producen inflamación crónica y disfunción de la glándula, como la pancreatitis hereditaria, también incrementan la posibilidad de sufrir CP [13, 14].

2.3 Clasificación

Desde un punto de vista histopatológico, la OMS propone una división de las lesiones pancreáticas exocrinas en la que se distinguen *lesiones benignas*, *lesiones "borderline"* o no claramente malignas cuya evolución es incierta, y por último *lesiones malignas*. De manera más práctica, los tumores pancreáticos normalmente se clasifican en función de sus características macroscópicas, diferenciando entre *tumores sólidos* y *tumores quísticos*.

Dentro de los *tumores sólidos* encontramos el PDAC, que como hemos comentado anteriormente, representa casi la totalidad de todos las neoplasias pancreáticas, y es un tumor altamente agresivo [16]. Entre los *tumores quísticos* son frecuentes la neoplasia mucinosa-papilar intraductal (IPMN) o la neoplasia quística mucinosa (MCN), ambas consideradas de tipo *"borderline"*, ya que pueden progresar hacia un carcinoma invasivo, y deben ser bien diferenciadas de otras *lesiones quísticas* que son en su mayoría *benignas*, como el cistadenoma seroso (SCN). Existe un tumor con apariencia *quística* y *sólida*, la neoplasia sólida pseudopapilar (SPN), clasificada también tipo *"borderline"*, dado que un 10% de estos tumores son agresivos [16].

Existe otro sistema de clasificación usado a nivel mundial, que consiste en la estadificación de los tumores sólidos, entre los que encuentra el CP, basándose en la extensión anatómica del tumor. A esta clasificación se le conoce como TNM y tiene en cuenta la invasión local del tumor primario (T), la afectación de los ganglios linfáticos (N) y la posible presencia de metástasis distantes (M). La combinación de estas tres características T, N y M del tumor nos proporciona el estadio o la etapa en concreto en el que se encuentra un paciente. Este sistema de estadificación fue desarrollado hace más de 50 años por el Comité TNM de la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y

Introducción

se ha ido modificando a través de los años, adaptándose a los cambios en el conocimiento sobre la oncología y la práctica clínica [17]. La clasificación TNM tiene una gran utilidad clínica para predecir el pronóstico de los pacientes y así poder decidir qué estrategias terapéuticas seguir a continuación. En el momento en el que se advierte la presencia de un tumor se debe determinar el estadio TNM del mismo. Normalmente, la clasificación TNM está dividida en cuatro estadios, de forma que el primero es el de menor malignidad, y va incrementándose hasta llegar al último donde los pacientes presentan un peor pronóstico. Para la estadificación del CP se utilizan los criterios recogidos en la tabla dispuesta a continuación (Tabla 1).

Categoría T (profundidad de la invasión local)			
Tx	No se puede evaluar tumor primario T-0: No evidencia de tumor primario		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Tumor limitado a páncreas \leq 2 cm		
T2	Tumor limitado a páncreas $>$ 2 cm		
T3	Extensión a órganos vecinos pero sin afectación de tronco celíaco o arteria mesentéricas superior (o con afectación, pero puede ser resecable)		
T4	Infiltración de tronco celíaco o arteria mesentérica superior (tumor irresecable)		
Categoría N (implicación de nódulos linfáticos)			
Nx	No se puede evaluar la afectación ganglionar		
N0	No hay nódulos linfáticos implicados		
N1	Metástasis ganglionar		
Categoría M (presencia de metástasis distantes)			
Mx	No hay información de metástasis distante disponible		
M0	No hay metástasis distante detectable		
M1a	Metástasis a distancia		
Clasificación de los estadios			
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1/T2/T3	N1	M0
III	T4	Algún N	M0
IV	Algún T	Algún N	M1

Tabla 1: Clasificación TNM y estadificación clínica para el CP (6ª edición) (tomada de [18]).

De forma simplificada podemos decir que en el CP, en el estadio I el tumor se encuentra limitado al páncreas. A partir del estadio II el tumor podría haberse diseminado hacia tejidos y órganos cercanos (IIA), e incluso a los ganglios linfáticos próximos (IIB). En este estadio también podrían estar afectados los vasos sanguíneos mayores cerca del páncreas, pero la circulación venosa puede ser aún restaurada y el tumor se sigue considerando local y extirpable. En el estadio III, el tumor se ha diseminado hacia los vasos sanguíneos que irrigan el páncreas y es posible que también a los ganglios linfáticos (Figura 3). En esta etapa el tumor es considerado localmente avanzado y ya no es posible su extirpación. Cuando la enfermedad ha alcanzado el estadio IV, el tumor se ha diseminado hacia órganos alejados como pueden ser el hígado, los pulmones o la cavidad peritoneal, y tampoco es extirpable.

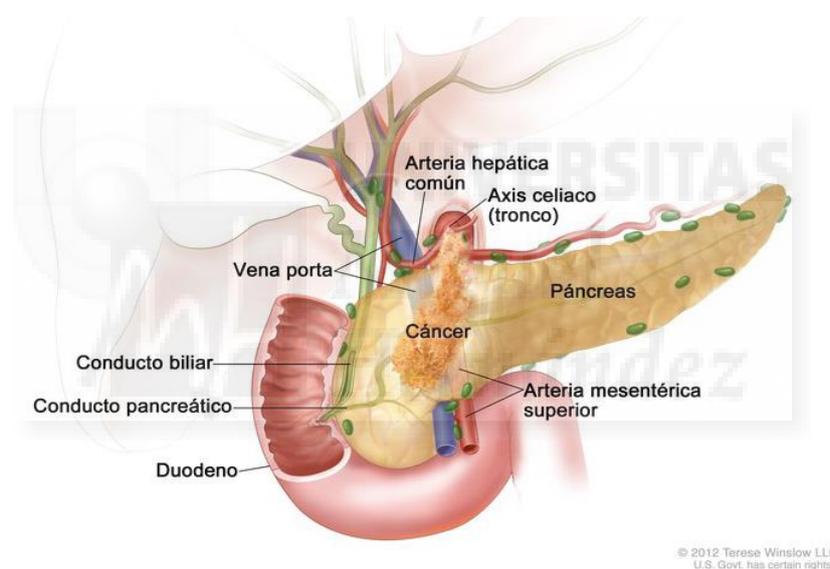


Figura 3: Imagen del estadio III en el CP. El tumor se ha diseminado hacia los vasos sanguíneos mayores que irrigan el páncreas como la arteria mesentérica superior, el axis celiaco, la arteria hepática común y la vena porta. También puede haber afectación de los ganglios linfáticos cercanos (tomada de <https://visualsonline.cancer.gov/>).

Algunos parámetros bioquímicos como los niveles séricos del antígeno carbohidratado (CA 19.9), un marcador tumoral de detección, pueden estar aumentados en los pacientes de CP, y en la actualidad puede ser utilizado para el seguimiento y vigilancia de la enfermedad en pacientes ya diagnosticados [9].

2.4 Alteraciones moleculares en el CP

La carcinogénesis del CP se ha descrito como una sucesión de cambios desde un epitelio normal hasta la aparición del cáncer, que incluye modificaciones histológicas

Introducción

junto con una acumulación de alteraciones moleculares específicas. El estudio y la caracterización de las modificaciones moleculares que se producen durante el desarrollo de la enfermedad han permitido entender con mayor detalle el proceso de esta enfermedad.

Histológicamente, los diferentes tipos de lesiones precursoras del CP se han organizado conforme a un nuevo sistema donde son clasificadas en varias etapas según las características de cada lesión, para conseguir un mejor diagnóstico y unificar criterios. Estas lesiones son denominadas neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanINs) [19]. En los primeros estadios de la enfermedad las lesiones son de naturaleza hiperplásica no-invasiva y son conocidas como PanIN-1. Estas lesiones evolucionan hacia lesiones hiperplásicas atípicas o de bajo grado de displasia, llamadas PanIN-2, y van adquiriendo anormalidades nucleares, hasta que llegan a un alto grado de displasia y al carcinoma *in situ*, o PanIN-3. Cada etapa histológica de este modelo de progresión del CP está asociada a unas alteraciones genéticas determinadas (Figura 4).

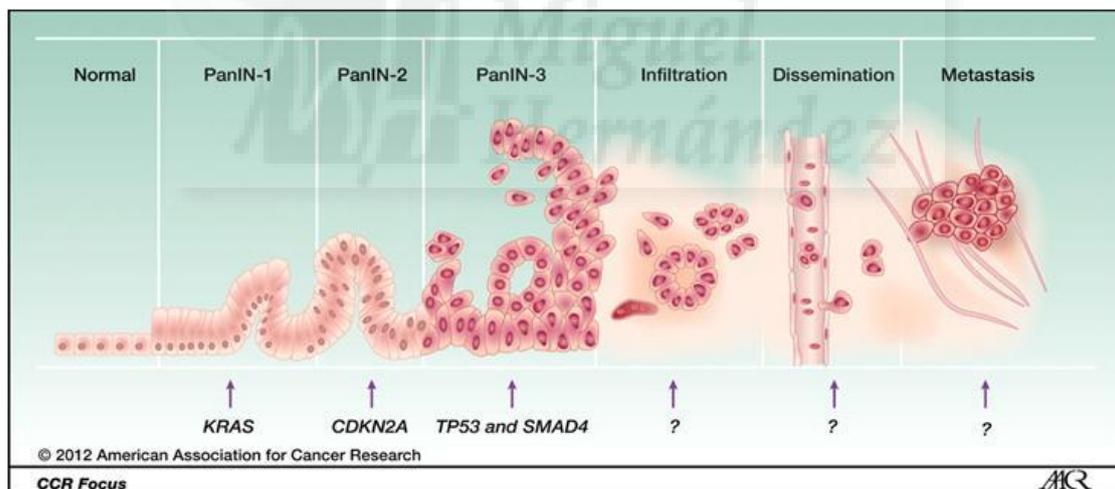


Figura 4: Modelo de progresión del cáncer de páncreas, mostrando las alteraciones genéticas que pueden producirse durante su desarrollo (tomado de [16]).

En las etapas tempranas (PanIN-1 y PanIN-2) están implicadas mutaciones como la activación del oncogén KRAS y la inactivación del gen supresor CDKN2A, ambos relacionados con la proliferación y supervivencia celular. Entre un 55-90% de los pacientes PC tienen alteraciones en KRAS, siendo la mutación más frecuente en este tumor, y además se ha descrito su relación con la carcinogénesis del CP. Las alteraciones se van acumulando en el transcurso del desarrollo de la enfermedad y en

etapas más avanzadas (PanIN-3), mutaciones en otros genes supresores de tumores como TP53, SMAD4, o BRCA2, son frecuentes en el CP [9, 16, 20, 21]. Como consecuencia de ello, procesos biológicos como la apoptosis, regulación del ciclo celular, control del daño en el ADN, rutas de señalización de K-Ras y TGF- β , entre otros, están alterados en la mayoría de los CP. Estas mutaciones son muy comunes en el CP, pero existe muchas otras que se presentan con muy poca frecuencia y aún se desconoce su papel en la oncogénesis de este tipo de tumores.

Además de las mutaciones anteriormente descritas, otras alteraciones genéticas se producen en el CP. Las aberraciones cromosómicas producidas por la pérdida o ganancia de regiones cromosómicas, y los cambios epigenéticos, que modulan la expresión de los genes, tienen una considerable importancia en el CP, al igual que en otros tipos de tumores. De hecho, el proceso epigenético de hipermetilación de ADN se produce con bastante frecuencia en el CP [22], y varios genes implicados en el desarrollo de este tumor sufren este proceso. La hipermetilación es un fenómeno frecuente en las células cancerígenas, por el cual se puede reducir, e incluso perder, la expresión de un gen, por lo que se puede producir la inactivación de genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN.

La consecuencia final de los cambios genéticos que se desarrollan durante la carcinogénesis del CP es la alteración de proteínas que participan en el desarrollo de esta patología y su malignidad. Concretamente, las modificaciones genéticas conllevan cambios en procesos tan importantes como el crecimiento celular, la adhesión celular, la invasión y la angiogénesis [21]. Probablemente un mejor conocimiento de las alteraciones genéticas relacionadas con el CP en un futuro permitirá predecir de forma más certera el riesgo de padecer este tumor y encontrar terapias más adecuadas para cada paciente.

2.5 Tratamiento y supervivencia

El mejor tratamiento para el CP, y la única posibilidad potencial de cura que existe en la actualidad para este tipo de tumor es la resección quirúrgica. Dependiendo de dónde este localizado el tumor, se puede utilizar el procedimiento quirúrgico de

Introducción

Whipple o duodenopancreatectomía, una pancreatectomía distal o pancreatectomía total. Además, al menos de 12 a 15 ganglios linfáticos deben ser resecaos [9].

Gracias a los avances en las técnicas de imagen utilizadas para el diagnóstico y valoración de la extensión de los tumores pancreáticos, como la tomografía computarizada (TC) helicoidal y la ultrasonografía endoscópica (USE) [23], la toma de decisiones sobre los pacientes que pueden ser operados ha mejorado sustancialmente y neoplasias en etapas tempranas pueden ser detectadas más fácilmente. Pero, como ya hemos comentado, la resección es posible en un número limitado de pacientes, y aun realizándose, la esperanza de vida para estos pacientes es muy corta. En principio, los datos indican que la resección con márgenes negativos, es decir, con márgenes libres de tumor, es posible en más de la mitad de los pacientes operados y la mortalidad debida al ingreso hospitalaria es muy baja. Lo llamativo es que a pesar de ello, las tasas de supervivencia a largo plazo no aumentan para estos pacientes. De momento, los motivos que impiden prolongar la supervivencia de los pacientes con tumor extirpable se desconocen, pero una de las opciones propuestas son las micrometástasis tempranas [24]. El CP tiene una gran capacidad de extenderse hacia otros tejidos, incluso en etapas iniciales de la enfermedad. Este hecho impide que la cirugía pueda erradicar con totalidad el tumor, lo que conlleva a recidivas en la mayoría de los pacientes [25].

Dado que la extirpación tumoral no es suficiente, además de que en la mayoría de los casos no es posible, en los pacientes de CP se utiliza de forma generalizada la *terapia adyuvante*. Esta terapia puede consistir en un tratamiento con *agentes quimioterápicos, radioterapia e inmunoterapia*, y se aplica tanto en los pacientes operados como en los que no se puede realizar la cirugía, como tratamiento paliativo.

La *quimioterapia adyuvante* estándar propuesta para el tratamiento del CP consiste en la administración de dos antineoplásicos análogos de las bases pirimidínicas, gemcitabina (GEM) y 5-Fluorouracilo (5FU). Más concretamente, los regímenes utilizados en clínica para tratar el CP están formados por la combinación de estos fármacos con otros agentes quimioterápicos que mejoran los beneficios producidos por la administración de GEM y 5FU como agentes únicos. Las opciones que ofrecen mayores probabilidades de éxito en la actualidad son la combinación de 5FU con

leucovorina, irinotecan y oxaliplatino (FOLFIRINOX), todos ellos fármacos usados también en el tratamiento del CCR. Además, la administración de GEM en suspensión coloidal con paclitaxel, un fármaco antineoplásico de la familia de los taxanos que afecta al citoesqueleto celular, y junto con erlotinib, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [26], también son utilizados. Aun así, los resultados positivos que aportan estos fármacos, en general, son muy limitados.

Otros fármacos han sido estudiados en combinación con GEM, aunque no han conseguido mejorar la supervivencia de los pacientes. Entre ellos está cetuximab [27], otro inhibidor de EGFR, y fármacos inhibidores del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), como bevacizumab [28] o axitinib [29], por citar algunos. Estudios con fármacos inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARP), que impiden la reparación del ADN, también están siendo evaluados como terapia contra el CP. Estos inhibidores de PARP están funcionando en pacientes con mutaciones en BRCA1/2 [26].

Por otro lado, el uso de la *radioterapia* se ha propuesto en los últimos años como una opción terapéutica en diferentes neoplasias. En el CP también se ha estudiado este método terapéutico combinado con la quimioterapia, pero los datos obtenidos hasta el momento no han sido lo suficientemente concluyentes para recomendar su utilización tras la cirugía del tumor. De hecho, los estudios realizados no encontraron diferencias significativas entre la supervivencia de los pacientes que recibieron quimio/radioterapia postoperatoria y los que no [30].

También se ha propuesto la administración de *terapias neoadyuvantes* para combatir el CP. Estas terapias consisten en la administración de quimio/radioterapia de forma preoperatoria, para conseguir una mejor resección, o para disminuir el tamaño de un tumor no extirpable o localmente avanzado. Los datos recogidos, tras varios estudios al respecto, han encontrado que no hay una mejoría en la supervivencia y/o en las tasas de resección de los pacientes con tumores extirpables. Sin embargo, una parte de los pacientes con enfermedad localmente avanzada o tumores no extirpables, se benefician del tratamiento preoperatorio y el tumor puede ser operado. Es por ello que el uso de la *terapia neoadyuvante* debe ser valorado en este tipo de casos [31].

Introducción

Por último, la *inmunoterapia* también se ha propuesto como un tratamiento alternativo frente al CP. El objetivo de esta modalidad terapéutica consiste en desarrollar una respuesta inmune de forma artificial frente a las células tumorales, utilizando vacunas que presenten antígenos expresados específicamente en estas células. Diferentes tipos de vacunas han sido probadas en ensayos clínicos y los resultados, aunque alentadores, por el momento no han sido lo suficientemente positivos para validar su uso. Además, la inmunosupresión que provocan los tumores hace necesario la combinación de esta terapia con otros fármacos moduladores de la respuesta inmune. Entre estas vacunas encontramos las diseñadas con proteínas que están alteradas frecuentemente en el CP, como K-Ras o la telomerasa, o las que utilizan células tumorales completas de líneas celulares tumorales pancreáticas irradiadas, o células dendríticas cargadas de antígenos tumorales, entre otras [32].

Como vemos, se han realizado numerosos esfuerzos para encontrar terapias realmente eficaces contra el CP y que incrementen la supervivencia de los pacientes. Por desgracia, este objetivo aún no ha sido alcanzado, por lo que nuevas estrategias terapéuticas deben seguir siendo estudiadas.

3. Cáncer colorrectal

3.1 Epidemiología

El CCR es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo y el cuarto respecto a número de muertes producidas. Para el año 2014 se estimaban casi 100.000 nuevos casos de CCR en los Estados Unidos para ambos sexos [10], número que nos da una idea de su alta incidencia. En nuestro país es el tercer tipo de cáncer más frecuente para hombres y el segundo para mujeres. Si tenemos en cuenta ambos sexos, es el cáncer con mayor incidencia en España [1].

Un dato característico de este tipo de cáncer es que la mayoría de los pacientes con CCR tienen más de 50 años cuando son diagnosticados, y la edad media de los pacientes que padecen este cáncer es muy alta, alrededor de los 70 años tanto para hombres como mujeres. También es típico del CCR producirse con más frecuencia en hombres que en mujeres. De hecho, los hombres afectados por este tumor superan en aproximadamente 100.000 casos a las mujeres con CCR a nivel mundial. En España, la

diferencia entre sexos no es tan significativa, pero también hay más incidencia en hombres, según el informe GLOBOCAN 2012 [1].

Los datos sobre CCR nos indican su alta incidencia, pero a pesar de ello, la mayoría de los casos se pueden curar si su detección es temprana. Es por ello que la etapa donde es diagnosticado es fundamental para el pronóstico de la enfermedad. Según los datos obtenidos en el proyecto Eurocare-4 para el CCR, se comprobó que la supervivencia para el CCR ha aumentado considerablemente en los países de la región europea, siendo este incremento más pronunciado en los pacientes más jóvenes [33]. Probablemente, la creciente accesibilidad de la población europea a los sistemas de detección precoz y el uso de tratamientos eficaces para CCR seguirán creando esta positiva tendencia.

3.2 Características

El CCR se produce cuando hay un crecimiento incontrolado de células del colon y/o el recto dando lugar a un tumor maligno. El CCR engloba las neoplasias que aparecen a lo largo del colon y en el recto. La mayoría de los tumores de CCR son de tipo epitelial, y en concreto el más frecuente es el adenocarcinoma, que representa el 90% de los CCR. En ocasiones también pueden originarse sarcomas, tumores carcinoides, melanomas o linfomas, pero son infrecuentes. En nuestro estudio, cuando hablamos de CCR nos referimos a los adenocarcinomas.

El adenocarcinoma es un tumor que va precedido de la aparición de lesiones premalignas conocidas como adenomas o pólipos adenomatosos [34]. Los pólipos son lesiones que crecen desde la mucosa de la pared interior del intestino grueso hacia la luz durante cierto tiempo, y pueden presentar diferentes tamaños, formas y comportamiento. La mayoría de ellos son pólipos que no degeneran en cáncer, pero en algunos de ellos las células del pólipo se convierten en cancerosas, comenzando a proliferar incontroladamente, y a invadir las diferentes capas que forman la pared intestinal desde la mucosa hasta la capa más externa, la serosa. A partir de aquí pueden llegar a invadir tejidos próximos, y finalmente producir metástasis distantes. Estos pólipos adenomatosos representan un factor de riesgo para el CCR, y normalmente son eliminados por endoscopia si son detectados.

Introducción

Anatómicamente, la mayoría de los tumores colorrectales se localizan en la zona descendente o izquierda del colon, concretamente en los últimos segmentos, en una parte llamada sigma. Dentro de los CCR, aproximadamente un tercio se producen en el recto. En las últimas décadas, algunos estudios han informado del cambio de tendencia por el aumento de casos de CCR en el colon ascendente, o lado derecho, sobre todo en los pacientes de mayor edad. Por el momento, se desconocen las razones reales de este cambio, pero se piensa que podría estar relacionado con el envejecimiento de la población y/o los cambios en los hábitos alimenticios hacia dietas pobres en fibra y ricas en grasa [35].

Etiológicamente, la mayoría de los CCR aparecen de forma esporádica, y los mayores factores de riesgo para padecerlo son la edad y el sexo masculino, ambos parámetros insalvables por el paciente. Otros factores, como antecedentes familiares de CCR o la enfermedad intestinal inflamatoria también aumentan considerablemente el riesgo de sufrir este tipo de tumor. En concreto, las personas con un pariente de primer grado con CCR diagnosticado con más de 50 años de edad tienen de 2 a 3 veces más riesgo de presentar este cáncer con respecto al resto de la población. Este riesgo puede aumentar hasta 6 veces si el pariente de primer grado es menor de 45 años, o si hay dos miembros de primer grado afectados [36]. De hecho, el CCR es uno de los tumores con un mayor número de pacientes con un parentesco familiar y se piensa que alrededor del 35% de los CCR podrían tener un origen relacionado con factores hereditarios, aunque las causas genéticas que los desencadenan no se comprenden totalmente.

Existe un 5% de casos de CCR asociados a factores hereditarios de los que sí se conoce su patogénesis molecular y las mutaciones genéticas relacionadas con ellos, y son los CCR que aparecen como consecuencia de un síndrome hereditario previo, como es el síndrome de Lynch (o cáncer colorrectal no-polipósico hereditario) o la poliposis adenomatosa familiar (FAP), entre otros. Cada síndrome tiene características clínicas propias, una etiología molecular diferente y un factor de riesgo asociado para desarrollar diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, los pacientes con síndrome de Lynch presentan un riesgo entre el 50-80% de desarrollar CCR, y es de un 100% para los pacientes con FAP [36].

El estudio de los factores genéticos como de los antecedentes familiares del paciente con CCR es muy importante. No solamente por el paciente en sí, sino porque nos permite valorar el riesgo que pueden tener los familiares a desarrollar CCR u otros tipos de tumores, y poder realizar un buen sistema de cribado. Las pruebas genéticas y la recogida de datos familiares ya forman parte de la práctica clínica actual, dentro de los métodos de detección temprana que se realizan para la población de riesgo, junto con el examen de sangre oculta en las heces, y las técnicas endoscópicas, como la colonoscopia y sigmoidoscopia flexible (SF). También se utilizan otras pruebas diagnósticas como el examen digital rectal, aunque tiene una limitada sensibilidad, o el doble contraste con enema de bario (DCBE), que es menos sensible que la colonoscopia pero puede hacer un examen radiológico de todo el colon y recto. Además, se están aplicando nuevas técnicas como la colonografía por TC, también llamada colonoscopia virtual [37].

3.3 Clasificación

Los tumores de CCR se pueden clasificar bajo muchos criterios, pero si tenemos en cuenta la clasificación histopatológica, el tumor más frecuente es el adenocarcinoma, como ya hemos dicho, seguido del adenocarcinoma mucinoso o coloide (más del 50% de la lesión está compuesta por mucina extracelular), que representa un 10-20% de los casos. Otros subtipos de tumores epiteliales menos frecuentes incluyen el adenocarcinoma de células en anillo de sello (más del 50% de las células presentan mucina intracelular), carcinoma adenoescamoso, carcinoma epidermoide (suele aparecer en la unión anorrectal), carcinoma medular, y carcinoma indiferenciado.

Otra forma de clasificar los tumores de CCR, que además es fundamental para un acertado diagnóstico, establecer un pronóstico de la enfermedad y elegir un plan de tratamiento, es la estadificación del CCR. Existen varias clasificaciones para estadificar el CCR, pero en la actualidad los criterios más utilizados son los que aparecen recogidos en la clasificación TNM para el CCR (Tabla 2) [38], al igual que ocurre para el CP.

Categoría T (profundidad de la invasión local)			
Tx	No hay información disponible sobre la infiltración del tumor local		
Tis	El tumor se limita a la mucosa, no hay infiltración de la lámina muscular propia		
T1	El tumor infiltra la lámina muscular mucosa hacia la submucosa		
T2	El tumor infiltra la lámina muscular propia, pero no más allá.		
T3	Infiltración de la subserosa y/o el tejido pericolónico o perirrectal no peritonealizado. No hay infiltración de la serosa u órganos vecinos.		
T4a	Infiltración de la serosa		
T4b	Infiltración de otros tejidos o órganos		
Categoría N (implicación de nódulos linfáticos)			
Nx	No hay información sobre nódulos linfáticos implicados		
N0	No hay nódulos linfáticos implicados		
N1a	Células cancerígenas detectadas en 1 nódulo linfático regional		
N1b	Células cancerígenas detectadas en 2-3 nódulos linfáticos regionales		
N1c	Satélites tumorales en la subserosa o en el tejido pericolónico perirrectal graso, nódulos linfáticos regionales no implicados		
N2a	Células cancerígenas detectadas en 4-6 nódulos linfáticos regionales		
N2b	Células cancerígenas detectadas en 7 o destacados nódulos linfáticos regionales		
Categoría M (presencia de metástasis a distancia)			
Mx	No hay información de metástasis a distancia disponible		
M0	No hay metástasis a distancia detectable		
M1a	Metástasis en 1 órgano distante o nódulos linfáticos distantes		
M1b	Metástasis en más de 1 órgano distante, o en un conjunto de nódulos linfáticos distantes o metástasis peritoneal.		
Clasificación de los estadios			
0	Tis	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
II A	T3	N0	M0
II B	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III A	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
III B	T3/T4a	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
III C	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2a	M0
	T4b	N1/N2	M0
IV A	Algún T	Algún N	M1a
IV B	Algún T	Algún N	M1b

Tabla 2: Clasificación TNM y estadificación clínica del CCR (7ª edición) (tomada de [38]).

Otros parámetros que se tienen en cuenta para el pronóstico del CCR son los niveles séricos de un marcador tumoral como el antígeno carcinoembrionario (CEA), que también es utilizado para vigilar la aparición de recurrencias locales y metástasis, además de ser usado para monitorizar la respuesta tumoral a un tratamiento [39]. Otros parámetros a tener en consideración son las complicaciones intestinales producidas por la presencia del tumor, como la perforación y/u obstrucción del intestino, y el estado de salud del paciente.

Para el CCR, la estadificación del tumor está dividida en cinco etapas. En el estadio 0 las células cancerosas se encuentran sólo donde han comenzado a formarse en la mucosa (*in situ*). En el estadio I la enfermedad está localizada y ha comenzado a extenderse a través de la pared intestinal, hasta las capas de músculo de la pared intestinal. En el estadio II el tumor llega a alcanzar la capa más externa de la pared intestinal, la serosa, y en la última etapa (II C) se disemina hacia el tejido adyacentes, pero todavía no hay implicados ganglios linfáticos (Figura 5). En el momento que los ganglios se ven afectados el tumor es considerado de estadio III. Por último, cuando hay metástasis en un órgano o varios que se encuentran distantes, el tumor ha alcanzado el estadio IV. Si la implicación es de un sólo órgano o sitio se considera estadio IV A, mientras que si hay en más de uno de ellos implicados se considera IV B.

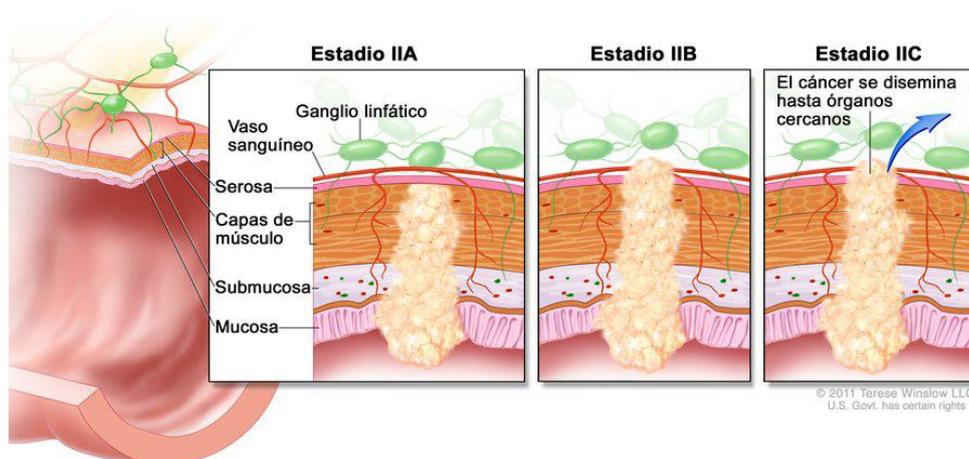


Figura 5: Imagen del estadio IIA, IIB y IIC del CCR. En el estadio IIA el tumor ha atravesado la mucosa, submucosa y las capas musculares hasta alcanzar la subserosa, pero aún no la ha sobrepasado. En el estadio IIB el tumor ha alcanzado la serosa, y por último, en el estadio IIC el tumor puede propagarse a los tejidos cercanos (tomada de <https://visualsonline.cancer.gov/>).

3.4 Alteraciones moleculares en el CCR

La tumorigénesis del CCR esta mediada por una serie de cambios moleculares, que se producen en las células de colon y recto, que como consecuencia desencadenan la enfermedad. Estos cambios suelen ser muy heterogéneos y están correlacionados con el desarrollo que sigue la enfermedad, por lo que su estudio es importante para un buen diagnóstico y para la elección del tratamiento de cada paciente. Las mutaciones más frecuentes afectan a genes relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular, con la supresión del crecimiento celular, o la reparación del ADN.

Como hemos mencionado, la mayoría de los CCR son esporádicos, es decir, se producen de forma espontánea sin que haya antecedentes familiares, y se desencadenan a partir de pólipos adenomatosos, en los cuales se van acumulando varias anormalidades genéticas, que con el tiempo finalizan en un adenocarcinoma. Este modelo de carcinogénesis propuesto para el CCR se conoce como secuencia adenoma-adenocarcinoma o vía clásica (Figura 6). Las alteraciones genéticas asociadas a este modelo se caracterizan por la pérdida de material cromosómico, frecuentemente en los cromosomas 5, 17 y 18 [40]. De hecho, una de las alteraciones que se observa en las primeras etapas de la tumorigénesis, y que se piensa que inicia la aparición de CCR, es la pérdida de un fragmento del brazo largo del cromosoma 5 provocando una mutación en el gen supresor de tumores APC. La pérdida de la funcionalidad de este gen se traduce en un incremento de la proliferación celular y evasión de la apoptosis. Esta alteración está presente en un 85% en los adenocarcinomas, y su mutación en línea germinal causa el síndrome hereditario FAP. En un número menor de casos el gen β -catenina está mutado en estas etapas iniciales. Lo interesante es que las proteínas α y β cateninas están reguladas por APC, por lo que las mutaciones en uno u otro gen causan similares alteraciones biológicas. Durante el proceso de tumorigénesis, que puede durar entre 20-40 años, otras mutaciones genéticas se van adquiriendo, y algunas de las más frecuentes son las que se producen en el oncogén KRAS y en el gen supresor de tumores TP53 [38, 41]. Hay que tener en cuenta que el CCR no se desencadena solamente por una mutación, sino que se produce a consecuencia de una secuencia de ellas, hasta la aparición del carcinoma. Por tanto, no todos los CCR presentan la misma acumulación de mutaciones, sino que cada uno sigue un patrón

hasta la transformación tumoral, y de ahí la gran variabilidad que muestra este tipo de tumor. Recientemente se ha descrito que alrededor de un 30% de los CCR se originan por una vía alternativa a la vía clásica llamada vía serrada, conocida así por las criptas que aparecen en las lesiones precursoras del tumor. Los carcinomas serrados suelen tener un mal pronóstico, y en ellos se dan con frecuencia mutaciones en BRAF o en KRAS [42].

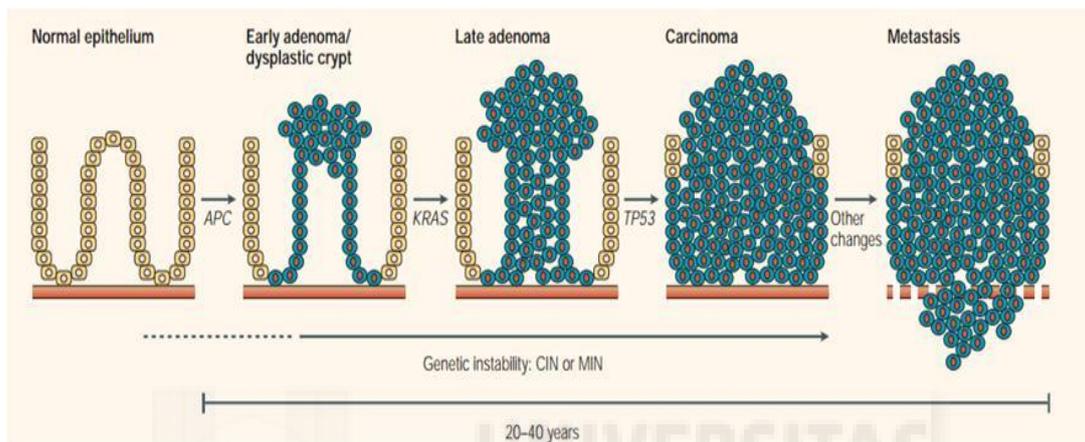


Figura 6: Modelo característico de tumorigénesis en el CCR. Estos tumores pueden desarrollarse durante años, debido a la acumulación de mutaciones genéticas específicas que tienen una secuencia característica, y por la inestabilidad genética (CIN o MSI), que aparece en algún momento del desarrollo del tumor (tomada de [43]).

Otro fenómeno implicado en la carcinogénesis de los CCR es la inestabilidad genética, ya sea cromosómica o de microsatélites. El término inestabilidad cromosómica (CIN) hace referencia al ritmo por el cual aparecen ganancias o pérdidas cromosómicas. Este ritmo se incrementa durante el desarrollo tumoral de los CCR, provocando que las células en división adquieran cambios genéticos de manera acelerada [43].

En otras células se produce otro fenotipo conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI o MIN). Cuando aparecen defectos en el sistema reparador de apareamiento de ADN (MMR), por la pérdida de funcionalidad de genes que forman parte de este sistema, las células tumorales adquieren con mayor facilidad mutaciones que se acumulan en unas secuencias llamadas microsatélites debido a su naturaleza repetitiva. Estas secuencias, o repeticiones cortas en tándem, son pequeños fragmentos de ADN que representan el 3% de nuestro genoma. El Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda (Estados Unidos) recomienda evaluar un panel de cinco microsatélites para

Introducción

determinar el estatus de un CCR en la clínica respecto al fenotipo MSI. Dependiendo de cuántos de estos 5 marcadores presentan alteraciones con respecto a las células normales, el CCR se clasificará en fenotipo de alta inestabilidad (MSI-H, más de 2 de los 5), baja inestabilidad (MSI-L, 1 de 5), o en estable (MSS, ninguno de los 5) [44].

Aproximadamente un 15% de los CCR esporádicos se caracterizan por tener alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) [38]. La mayoría de estos tumores se desarrollan a través de rutas moleculares que implican otros cambios, como el incremento de los niveles de metilación de las islas CpG (regiones del ADN con gran concentración de dinucleótidos de guanina y citosina). Si el tumor tiene esta característica se considera como fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). La MSI-H también se produce en los CCR no esporádicos, y en concreto está relacionado con el CCR hereditario más común, el asociado con el síndrome de Lynch. Por el contrario, en el segundo síndrome hereditario más frecuente, FAP, ocurre el fenómeno contrario, y no hay inestabilidad de microsatélites (MSS o MSI-L) (Figura 7).

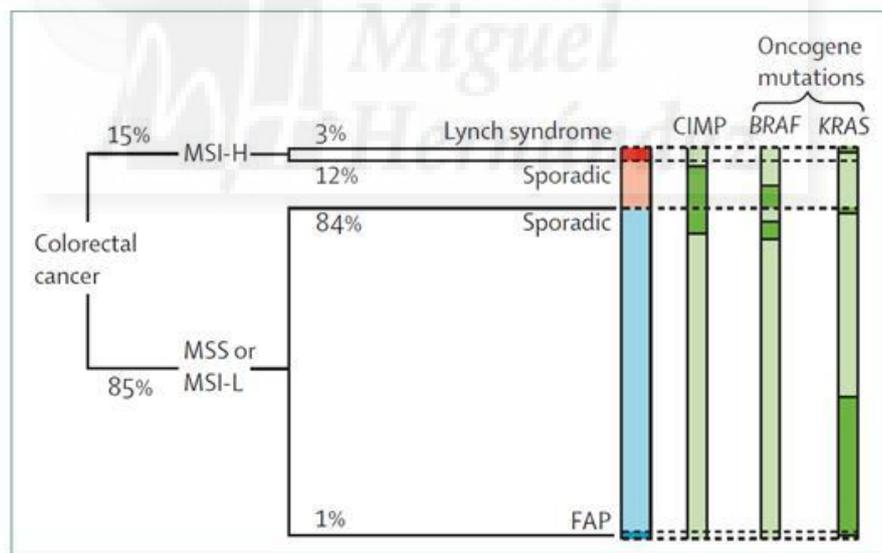


Figura 7: Representación de los subtipos moleculares de CCR. Los CCR en azul tienen fenotipo de MSS o MSI-L; en claro los esporádicos y en oscuro los hereditarios (FAP). Los CCR rojo y rosa tienen fenotipo de MSI-H, en rojo el síndrome hereditario de Lynch y en rosa los esporádicos. En verde se describen los cambios moleculares típicos incluyendo la CIMP y mutaciones de los oncogenes KRAS o BRAF. En verde oscuro aparece la proporción de cambios positivos o mutaciones y en color verde claro la proporción de cambios negativos o de tipo salvaje (tomado de [38]).

Los CCR con fenotipo MSI-H muestran unas características que los hacen diferentes al resto: se presentan en el colon proximal (ascendente), aparecen múltiples

tumores de forma sincrónica, están relacionados con causas hereditarias si tienen lugar en personas menores de 50 años [45], y no suelen producir metástasis. Además, son pacientes con un mejor pronóstico que los que presentan fenotipo MSS. Los fenotipos MSS o MSI-L tienden a afectar más al colon distal (descendente) y suelen ser polipoideos. Ser capaces de distinguir entre uno y otro es muy importante tanto por el pronóstico como para la elección del tratamiento.

3.5 Tratamiento y supervivencia

En la actualidad, la *resección quirúrgica* del tumor primario sigue siendo el tratamiento de elección para el tratamiento de pacientes con CCR en los primeros estadios (0, I, II y III) de la enfermedad. Con ella se retira tanto el tumor como los vasos linfáticos involucrados. Se ha recomendado el examen de al menos 12 ganglios linfáticos para una correcta distinción entre el estadio II y III [46], y otros nódulos alejados del tumor que puedan estar implicados también deben ser analizados. Las técnicas quirúrgicas utilizadas dependen de la localización del tumor, y son diferentes para el colon derecho, izquierdo y el recto. Las operaciones pueden ser por cirugía abierta o por cirugía laparoscópica colorrectal. Esta última se ha presentado como una alternativa equivalente a la cirugía abierta tradicional, y ha mostrado algunos beneficios para los pacientes como la reducción de la pérdida de sangre y el dolor producido por la intervención, una recuperación más rápida de la función intestinal y un menor tiempo de estancia en el hospital [47]. En el caso del cáncer rectal se utilizan técnicas quirúrgicas de extirpación local como la resección microquirúrgica endoscópica transanal (MET), o más agresivas como la escisión total del mesorrecto (ETM). En general, la cirugía en este tipo de tumores tiene una alta tasa de cura, con un 50% para el cáncer de colon, si el tumor está limitado al intestino, y un 45% para el cáncer rectal, si solamente se presenta con invasión local [48].

Para los pacientes con CCR en estadio I la resección quirúrgica en la mayoría de los casos es curativa y no suelen necesitar ningún tratamiento adicional. Pero por desgracia, todavía la gran mayoría de los pacientes son diagnosticados en los estadios II y III, donde hay un alto riesgo de sufrir recidivas, que son la causa de muchas de las muertes tras la extirpación del tumor. Para evitar la posibilidad de futuras recaídas, los pacientes en los estadios II y III son tratados con una *terapia adyuvante* después de la

Introducción

cirugía. Esta terapia consiste en un tratamiento farmacológico con quimioterápicos, y en algunas ocasiones incluso radioterápico.

Hay que tener en cuenta que a pesar de que la terapia adyuvante se ofrece a los pacientes en estadio II y III, no todos los pacientes en estadio II se ven favorecidos por esta terapia. Concretamente, en el cáncer rectal no existen datos suficientes para demostrar el beneficio de su utilización, pero es una opción que está recomendada en numerosas guías oncológicas. Algo similar pasa con los pacientes de cáncer de colon, donde no todos los estudios han encontrado evidencias positivas con respecto a la terapia adyuvante y su utilización es controvertida. Un estudio que revisó la literatura relacionada con este tema concluyó que aunque la terapia adyuvante no aumente la supervivencia global de los pacientes, sí es capaz de aumentar el tiempo libre de enfermedad [49]. Como la utilización de la quimioterapia no está libre de efectos adversos, una mejor selección de los pacientes en estadio II, sobretodo atendiendo a sus características de alto riesgo y los que muestran un peor pronóstico, sería lo ideal y debería realizarse tras una decisión médico/paciente de forma individualizada.

En pacientes de cáncer de colon en estadio III (el tumor se ha diseminado fuera del colon y ha afectado a los nódulos linfáticos que lo rodean), las evidencias sobre el beneficio de la utilización de quimioterapia adyuvante postoperatoria están claras, siendo capaz de disminuir la aparición de recidivas y aumentar la supervivencia de los pacientes. Actualmente, los regímenes quimioterápicos están compuestos por el agente antineoplásico 5FU, o su pro-fármaco oral capecitabina, junto con el agente alquilante del ADN oxaliplatino (OXA). Estos fármacos forman parte del tratamiento de primera línea contra el cáncer de colon en estadio III a nivel mundial. El 5FU suele ir acompañado del fármaco coadyuvante leucovorina o ácido folínico (LV), que mejora los efectos antitumorales de 5FU, ayudándolo a impedir el funcionamiento de la enzima timidilato sintetasa, su principal diana. También es utilizada una formulación compuesta por tegafur, otro pro-fármaco oral de 5FU, y uracilo (UFT), junto con LV (UFT/LV) [48]. En este caso, el uracilo compite por la degradación de 5FU, mejorando su biodisponibilidad. Otras combinaciones utilizadas para el tratamiento del CCR están compuestas por 5FU/LV/OXA (FOLFOX) o capecitabina/OXA (XELOX). De hecho, los regímenes que incluyen OXA han sido comparados con la administración de 5FU/LV

solamente en tres grandes ensayos prospectivos [50-52] en los que se ha demostrado que la administración conjunta con OXA mejora la supervivencia de los pacientes.

Además de las combinaciones descritas, otros tipos de fármacos también han sido estudiados para tratar el CCR. Uno de ellos es un derivado sintético del agente antineoplásico camptotecina, el pro-fármaco irinotecan, cuyo mecanismo de acción está basado en la inhibición de la enzima nuclear topoisomerasa I. Este fármaco ha sido combinado en ensayos clínicos junto con 5FU/LV/OXA (FOLFIRINOX) o con 5FU/LV (FOLFIRI), aunque los efectos antitumorales producidos por esta última combinación en comparación 5FU/LV, en pacientes en estadio II o III no han sido muy positivos [53, 54]. Otros agentes quimioterápicos estudiados en diversos ensayos clínicos como terapia adyuvante para el CCR incluyen la administración de metotrexato, un análogo del ácido fólico, combinado con 5FU/LV [55], o anticuerpos monoclonales: bevacizumab [56] o cetuximab [57] junto con FOLFOX. Según los resultados de los estudios que acabamos de citar, algunos de estos fármacos son capaces de mejorar algunos parámetros de eficacia, pero los datos de supervivencia global de los pacientes con respecto a la administración de la terapia estándar sola no se han incrementado. Aun así, estas y otras combinaciones se encuentran bajo estudio en numerosos ensayos con pacientes, y son utilizados como tratamientos de primera y segunda línea en pacientes con CCR metastásico, o en terapias de rescate cuando los pacientes no responden a los tratamientos con 5FU, como comentaremos más adelante.

Para los pacientes de CCR en estadio IV que presentan metástasis distantes, el tratamiento de elección es la extirpación de la metástasis, tanto en el hígado [58] como en el pulmón, donde la resección es una opción de tratamiento cada vez más utilizada [59]. En ambos casos, la intervención quirúrgica sólo es considerada siempre que se pueda realizar de forma segura para el paciente y sea técnicamente posible. Desafortunadamente, existe un bajo número de pacientes donde pueda efectuarse. En los pacientes en los que la resección es posible, la terapia adyuvante es administrada en los pacientes con un mal pronóstico. Por el contrario, en los pacientes con muy bajo riesgo de recidivas, el seguimiento del paciente suele ser suficiente. En los casos en los que la resección de la metástasis no es posible, la quimioterapia es la única alternativa que queda para controlar el crecimiento del tumor, y se ofrece de forma paliativa al

Introducción

paciente para aumentar sus posibilidades de supervivencia y su calidad de vida. En algunos casos, el tumor que inicialmente era inoperable, puede llegar a serlo tras el tratamiento quimioterápico, motivo por el cual también es recomendada. En cuanto a las terapias utilizadas en este estadio, encontramos las quimioterapias basadas en los antineoplásicos 5FU, OXA, capecitabina e irinotecan, siempre que los pacientes puedan tolerar estos tratamientos y que haya una respuesta positiva. Otra posibilidad que ha dado resultados beneficiosos en pacientes en estadio IV es la combinación de los regímenes convencionales con fármacos dirigidos frente a una diana molecular específica. Ejemplo de ello son los inhibidores de EGFR, como cetuximab o panitumumab en pacientes con KRAS tipo “wild type” [60], inhibidores de la angiogénesis, como bevacizumab [61], o inhibidores multiquinasas, como regorafenib [62]. Estas terapias también pueden ser usadas como un tratamiento alternativo o terapia de rescate en los pacientes en los que aparecen mecanismos de resistencia al tratamiento farmacológico convencional, un fenómeno descrito y conocido en este tipo de cáncer.

Cuando hablamos de cáncer rectal, la aparición de recidivas locales en los pacientes es más frecuente que en el cáncer de colon, y muchas veces están relacionadas con la imposibilidad de alcanzar un margen de resección circunferencial (CRM) del tumor sin afectación, debido a la localización del tumor rectal en la zona pélvica. El CRM representa la distancia mínima entre el tumor y el borde libre de resección, y se considera negativo a partir de los 2 mm de separación. Es un factor pronóstico, ya que una disminución del CRM se relaciona con un mayor número de recidivas locales y a distancia, y una menor supervivencia de los pacientes [63].

Las nuevas técnicas quirúrgicas han mejorado la cantidad de CRM negativos en los pacientes con cáncer rectal, pero también ha sido posible gracias a la utilización a menudo de un tratamiento preoperatorio o *neoadyuvante*. Esta terapia neoadyuvante es aplicada en los pacientes antes de realizar la resección del tumor y consiste en utilizar radioterapia local, junto con quimioterapia en algunos casos. La radioterapia disminuye la aparición de recidivas locales postoperatorias en el recto [64, 65], algo frecuente en este tipo de pacientes, y además, se ha visto que los pacientes que se

someten a este tratamiento presentan mayores tasas de supervivencia con respecto a los que se les aplica cirugía solamente [66].

La *terapia neoadyuvante* es recomendada en pacientes de cáncer rectal en el estadio II y III [48], aunque no está claro si todos los pacientes se ven favorecidos por su uso, dado que esta terapia también implica efectos adversos. El modo de aplicar la radioterapia también está en debate, y tanto una exposición corta de alta intensidad de radiación, como una exposición más larga de menor intensidad, han demostrado su eficacia en diferentes ensayos. La radioterapia también puede ser suministrada tras la operación, pero los últimos estudios sugieren que su utilización preoperatoria es más eficaz y menos tóxica [67]. La administración de quimioterápicos tras la operación como terapia adyuvante también es una opción recomendada en algunos pacientes en estadio II y III de la enfermedad [48].

Las nuevas técnicas quirúrgicas, los avances farmacológicos y radioterápicos, y un enfoque clínico multidisciplinar han ayudado a aumentar la supervivencia de los pacientes de CCR en general en los últimos años, aunque se debe seguir trabajando para conseguir mejorar el pronóstico de los pacientes con CCR.

4. Una nueva diana terapéutica: HSP90

4.1 Las proteínas de choque térmico (HSPs)

Uno de los mecanismos que presentan las células para combatir los daños externos que se les presentan consiste en utilizar e incrementar la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de respuesta al estrés o de choque térmico (del inglés *Heat Shock proteins*, HSPs).

Las HSPs se observaron por primera vez en 1962 en respuesta al estrés en *Drosophila* [68], y a partir de su descubrimiento, numerosos estudios comprobaron que durante procesos estresantes para la célula, como un aumento de la temperatura basal, inflamación e infecciones, toxinas, compuestos oxidantes y metales pesados, se induce su expresión genética [69]. Las HSPs intentan restablecer el balance y la homeostasis celular, actuando como un mecanismo de defensa y ejerciendo un efecto citoprotector frente a agentes externos.

Introducción

Hoy en día se sabe que las HSPs son proteínas que se encuentran en la naturaleza altamente conservadas y son expresadas en condiciones basales por las células de forma constitutiva. Su función principal es actuar como chaperonas moleculares, un concepto que comenzó a utilizarse en la década de los 80 [70], que hace referencia a las proteínas que ayudan al correcto plegamiento de otras proteínas celulares para que éstas puedan realizar su función, impidiendo plegamientos incorrectos y agregaciones entre proteínas. Cuando se producen situaciones de toxicidad que generan estrés en las células, las HSPs intentan corregir plegamientos incorrectos y recuperar la normalidad celular.

En general, las HSPs participan en procesos fundamentales para las proteínas como ayudar en el plegamiento de proteínas *de novo*, estabilizar proteínas que se encuentran desplegadas, facilitar el transporte de proteínas a través de membranas y colaborar en el ensamblaje/desensamblaje de complejos transcripcionales [71, 72].

Existen diferentes tipos de HSPs y se engloban en 6 familias, conocidas en función a sus pesos moleculares expresado en kilodaltons (kDa): HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, y las HSP pequeñas (de 20 a 25 kDa). La mayoría de los miembros de todas las familias participan activamente en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, pero también en procesos de translocación de membrana, como las HSP70, o en la degradación de complejos defectuosos, como las HSP pequeñas [72].

Las HSPs se caracterizan por actuar dentro de complejos formados por varias proteínas accesorias o co-chaperonas. Este hecho es muy conocido en el caso de las chaperonas HSP90 y HSP70, para las cuales se han descrito numerosas proteínas que participan junto a ellas, tanto para activar su función como todo lo contrario. Estos complejos están modulados por la actividad adenilpirofosfatasa (ATPasa); es decir, necesitan un aporte energético para realizar su función, y son cíclicos, por lo que cada vez que el adenosín trifosfato (ATP) es hidrolizado, el complejo se pone en marcha y así sucesivamente [73].

Además, las HSPs suelen encontrarse incrementadas en los tejidos tumorales de muchos tipos de cánceres, y su sobreexpresión se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad [74-77]. Esto tiene mucho sentido, si pensamos que las HSPs ayudan a

las células cancerígenas a mantener la normalidad celular en el microambiente con acidosis, hipoxia y carente de nutrientes [78] que se genera en los tumores, y donde la síntesis de proteínas es mucho más intensa. Además, las HSPs pueden estabilizar proteínas mutadas que en condiciones de normalidad no serían toleradas por la célula y la conducirían hacia la muerte [79], y degradar proteínas irremediablemente dañadas.

4.2 La HSP90

La HSP90 es la chaperona de choque térmico más conocida y estudiada. Las células eucariotas presentan una cantidad considerable de HSP90 en condiciones normales [80], representando entre 1-2% de las proteínas celulares. Además es una proteína altamente conservada, desde las bacterias hasta los mamíferos, y necesaria para la viabilidad celular [81].

Existe toda una familia de HSP90 formada por varias isoformas localizadas en diferentes compartimentos celulares. En el citosol se encuentran las dos isoformas mayoritarias. Una de ellas es altamente inducible, la HSP90 α , y la otra se expresa de forma constitutiva en condiciones de normalidad, la HSP90 β . HSP90 β también puede ser inducida pero en menor medida que HSP90 α . En general, ambas isoformas tienen funciones similares y redundantes, y todavía no están claras las funciones específicas que presenta cada una, pero parece que HSP90 β está más relacionada con procesos de adaptación celular a largo plazo, y HSP90 α se asocia con funciones citoprotectoras debido a su rápida inducción [82]. Los estudios también muestran que las dos isoformas, HSP90 α y HSP90 β , interaccionan de manera similar con otras co-chaperonas y sustratos, con la excepción de algunas proteínas que se unen preferentemente por HSP90 α en condiciones de estrés [83].

Otras isoformas de HSP90 han sido descritas. Una de ellas, HSP90N, fue identificada como una nueva isoforma con la particularidad de tener el dominio amino-terminal sustituido por una secuencia modificada [84], aunque otros autores no han podido corroborar que el gen HSP90N esté presente en el genoma humano [85]. Además, existen dos análogos de HSP90 no citoplasmáticos. Uno es la proteína regulada por glucosa 94 (GRP94), que se encuentra en el retículo endoplasmático y tiene funciones relacionadas con el plegamiento y ensamblaje de proteínas secretoras y de

membrana [86]. El otro, se localiza principalmente en la matriz mitocondrial y fue identificado como una proteína de interacción con el receptor del factor de necrosis tumoral tipo I (TRAP1). Es poco conocido, pero se piensa que participa mantenimiento de la integridad mitocondrial, tiene funciones citoprotectoras, e incluso interviene en el control de calidad de proteínas mitocondriales en el retículo endoplasmático [87, 88].

4.3 Estructura y funcionamiento de HSP90

La HSP90 es una proteína relativamente grande, está compuesta por 724 aminoácidos divididos en tres dominios diferentes [89] (Figura 8):

- dominio amino-terminal (N) muy conservado de ~ 25 kDa
- una región enlazadora
- un dominio central de ~ 40 kDa
- un dominio carboxi-terminal (C) de ~ 12 kDa



Figura 8: Esquemática representación de los dominios de HSP90.

El dominio N es el sitio de unión de ATP y es responsable de la actividad ATPasa, necesaria para que HSP90 funcione [90]. Este dominio está unido al dominio central a través de un segmento proteolíticamente sensible y altamente cargado, que se considera un conector covalente entre el dominio N y el resto de la proteína, y es conocido como la región enlazadora. Por el momento, se desconoce el papel que desempeña la región o dominio central, aunque algunas hipótesis apuntan a que proporciona un sitio de unión para los sustratos de HSP90. El dominio C proporciona una interfaz de dimerización imprescindible para el funcionamiento de HSP90 y posibilita un sitio de unión para las co-chaperonas de HSP90. Asimismo, estudios posteriores descubrieron un segundo sitio de unión para ATP en el dominio C [91], aunque se desconoce si contribuye a la actividad ATPasa.

En el citoplasma, las isoformas mayoritarias de HSP90 existen formando principalmente un homodímero de dos subunidades de HSP90 idénticas ($\alpha\alpha$ o $\beta\beta$), aunque también pueden hallarse monómeros (α o β), heterodímeros ($\alpha\beta$), e incluso

oligómeros [82]. Los dímeros de HSP90 se constituyen a través de la unión de los dominios C y/o N, aunque el modo de unión es diferente para cada uno de ellos [92]. La dimerización de HSP90 entre los dominios C es inherente e independiente de ATP, y la interacción es producida por enlaces intermoleculares. La unión de dos dominios C crea un bolsillo en forma de V entre las dos cadenas de HSP90. Al mismo tiempo, los dominios N de las HSP90 que forman el dímero también pueden estar unidos, "cerrando" la conformación en V que ya había formado la unión de los dominios C. En este caso, la conexión es transitoria y está estrechamente asociada a la unión y la hidrólisis de ATP [93]. La unión de ATP promueve el acercamiento de los dominios N del dímero de HSP90, y tras la hidrólisis de ATP las cadenas de HSP90 se disocian, volviendo a una conformación "abierta" del dímero [94].

Por tanto, la unión de ATP y la actividad ATPasa está ligada a los cambios conformacionales que se producen entre dos moléculas de HSP90. De hecho, gracias al estudio del papel de ATP en HSP90 se mostró que existen al menos dos conformaciones diferentes para HSP90, que están asociados al intercambio ATP/ADP. Una donde los dominios N están separados, conocido como estado abierto o ligado a ADP, y otra donde están conectados, conocido como estado cerrado o ligado a ATP [95-97].

Además, HSP90 se une a otras chaperonas, en concreto a co-chaperonas, proteínas moduladoras de la actividad ATPasa, y a proteínas accesorias, formando un complejo multi-proteico para realizar sus funciones [73]. Dentro de los componentes más destacados y estudiados que participan junto con HSP90, se pueden nombrar otras chaperonas de choque térmico, como HSP70 y HSP40, las proteínas adaptadoras HIP y HOP, y varias co-chaperonas como Ccd37/p50, AHA1, p23, o inmunofilinas (FKBP52, FKBP51, CyP40). Cada una tiene una función distinta en la regulación de la actividad de HSP90 dentro del complejo multi-proteico o maquinaria multi-chaperona (Tabla 3).

Nombre	Función	Referencia
HSP70	Participa de manera importante junto a HSP90, y es utilizado como biomarcador de la inhibición de HSP90	[98]
AHA1	Activador de la actividad ATPasa de HSP90	[99, 100]
p23	Participa en la estabilización del complejo con proteínas clientes y retrasa la actividad ATPasa de HSP90	[101]
HSP40	Estimula la actividad ATPasa de HSP70	[102, 103]
HOP, HIP	Proteínas adaptadoras para el acoplamiento entre HSP90 y HSP70. HOP impide la actividad ATPasa de HSP90	[104]
Cdc37/p50	Detiene la actividad ATPasa de HSP90 ayudando a proteínas clientes quinasas a unirse a HSP90	[105]
Inmunofilinas (IPs)	Co-chaperonas típicamente asociadas a receptores hormonales en el estado maduro de HSP90, modulando su acción	[106]

Tabla 3: Componentes generales que participan en la maquinaria multi-chaperona de HSP90.

La maquinaria multi-chaperona de HSP90 tiene, de forma simplificada, como objetivo final que una proteína sustrato, también llamada proteína "cliente", cumpla su finalidad. Se ha propuesto un modelo de funcionamiento de HSP90 en el que se explica cómo la maquinaria multi-chaperona de HSP90 se forma siguiendo unos pasos secuenciales entre las dos conformaciones que genera el intercambio ATP/ADP (Figura 9). Al inicio, la proteína cliente se asocia con las chaperonas HSP70 y HSP40 y el adaptador HIP, formándose un complejo inicial. A continuación, HOP recluta este complejo inicial a través de HSP70 y lo une a HSP90. El complejo ya con HSP90 interacciona con la proteína cliente. En este momento, HSP90 se encuentra en su conformación abierta o ligada a ADP, también conocido como complejo intermedio. Con el intercambio de ADP a ATP, se produce el cambio conformacional de HSP90 a su estado cerrado o ligado a ATP, tras la dimerización de los dominios N. Este cambio va acompañado de la liberación de componentes asociados al complejo intermedio, y permite la asociación de HSP90 con otras co-chaperonas como p23, Cdc37/p50, AHA1 e inmunofilinas (IPs), formando el complejo maduro. En este momento la proteína cliente puede ser plegada y estabilizada, e incluso puede permanecer un tiempo hasta que es activada para realizar su función [107, 108].

Si una proteína cliente queda atrapada en el complejo intermedio, se favorece su ubiquitinación. De esta forma, las proteínas clientes que no son estabilizadas o

activadas por HSP90 son eliminadas. Para realizar este proceso el complejo recluta a otras co-chaperonas como CHIP, que es una proteína ligasa de ubiquitina E3 capaz de interactuar con HSP70 o HSP90, y a su vez con enzimas de conjugación de ubiquitina E2. Si esto ocurre la proteína cliente es marcada para que se dirija hacia el proteosoma, donde es degradada [109].

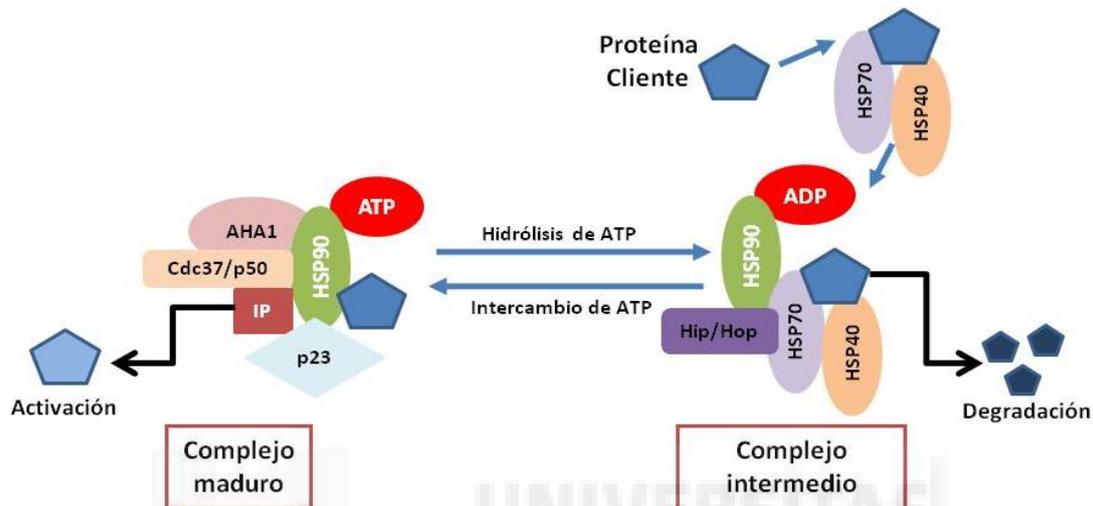


Figura 9: Modelo esquemático de la maquinaria multi-chaperona de HSP90 en el complejo maduro e intermedio (basado en el modelo sugerido por [107]).

4.4 Proteínas clientes de HSP90

La importancia biológica de HSP90 reside en que es necesaria para que un gran grupo de sustratos o proteínas clientes con relevancia en el control del crecimiento, supervivencia y diferenciación celular, funcionen correctamente [108]. Cuando una proteína recién sintetizada o inactiva se une a HSP90 puede sufrir diferentes modificaciones post-traduccionales (Figura 10). Por un lado, la proteína cliente dentro de la maquinaria multi-chaperona puede ser activada, ya sea por unión a su ligando, por unión a otras subunidades, o por su fosforilación. Además la asociación de una proteína cliente con HSP90 puede evitar su agregación, e incluso puede ayudarla a desplazarse en el interior de la célula. Por otro lado, si no se producen los estímulos adecuados, la proteína cliente puede ser eliminada a través del proteosoma [73]. Los detalles de los mecanismos moleculares por los que las chaperonas interactúan y provocan cambios en las proteínas clientes aún no son conocidos. Pero lo que está claro es que HSP90 participa en modificaciones proteicas de sus proteínas clientes, o también puede determinar su destrucción [110], lo que le confiere una gran influencia sobre ellas.

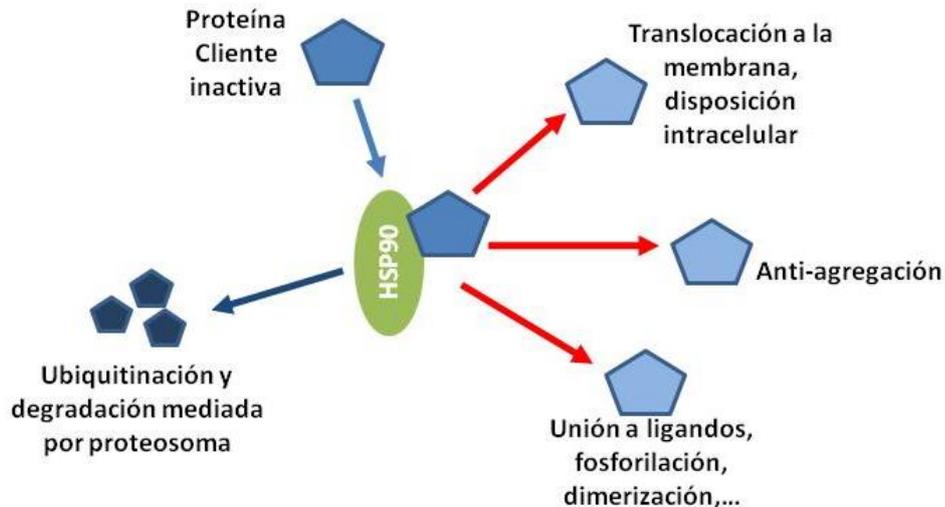


Figura 10: Representación esquemática de las modificaciones post-traduccionales en las que participa HSP90 cuando se une a una proteína cliente (basada en el esquema propuesto por [73]).

Además, es conocido que los clientes de HSP90 constituyen un amplio catálogo de proteínas de naturaleza variada, entre las que podemos encontrar proteínas quinasas y factores de transcripción relacionados con numerosas rutas de transducción de señales y respuestas transcripcionales [111, 112]. El grupo más numeroso de proteínas clientes de HSP90 lo representan las proteínas quinasas, y como ejemplo podemos nombrar a proteínas de la familia tirosín-quinasa, como Src o los receptores EGFR, HER2 o IGF1R, quinasas serina/treonina, como Raf-1 o Akt, o quinasas implicadas en el ciclo celular, como Wee1 o Cdc-2. Otro grupo está formado por un menor número de proteínas, pero que han sido ampliamente estudiadas, como son los factores de transcripción (ej. p53), o receptores esteroideos (glucocorticoides, andrógenos, estrógenos y progesterona). Por último, existe un conjunto de proteínas que no tienen relación estructural entre ellas y se engloban en un tercer grupo de proteínas clientes [71, 97].

Las proteínas anteriormente nombradas son sólo un pequeño ejemplo de la variedad de proteínas que son clientes de HSP90, y la cantidad de procesos celulares que pueden verse afectados por un incorrecto funcionamiento de HSP90. De hecho, en la actualidad se conocen más de 500 proteínas reguladas por HSP90, teniendo en cuenta solamente las isoformas citosólicas de HSP90, y es probable que queden más por descubrir. La larga lista de proteínas clientes de HSP90 se puede consultar en el sitio

web del laboratorio del Dr. Picard, que contiene un listado actualizado (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>, visitado en marzo de 2014).

4.5 El cáncer y la chaperona HSP90

Teniendo en cuenta la cantidad de proteínas que pueden ser reguladas por HSP90, no es sorprendente que esta chaperona esté implicada en multitud de procesos celulares como ya hemos comentado, e incluso patológicos. Entre todos ellos, muchos esfuerzos se han dirigido al estudio de la relación de las chaperonas y el cáncer.

Las células cancerígenas son capaces de adaptarse y superar los estímulos estresantes a los que están sometidas. Como se comentó anteriormente, incrementar los niveles de expresión de las chaperonas HSPs ayuda a restablecer la homeostasis celular, que queda comprometida por el microambiente tóxico que producen los tumores. Partiendo de esta idea, las células que han superado los cambios a los que son sometidas durante la progresión de la enfermedad tumoral podrían presentar una mayor expresión de HSPs, y en concreto de HSP90. De hecho, algunas células tumorales incrementan de 2 a 10 veces sus niveles de HSP90 comparado con sus homólogos normales [107], por lo que HSP90 podría representar un papel relevante en el desarrollo y la supervivencia de estas células. Además, el incremento de HSP90 se ha relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad tumoral [113, 114] y la progresión del tumor [115], y algunos estudios han evidenciado que no solamente puede estar inducida su expresión, sino que HSP90 es más activa en los tejidos afectados, en comparación con los tejidos normales próximos, donde su actividad es menor [116]. En las células tumorales, esta chaperona puede estar inducida, activada e incluso puede localizarse en la superficie celular y liberarse al espacio extracelular (Figura 11) [117].

Existen otros motivos, aparte de su efecto citoprotector, que explican que HSP90 se exprese más y/o funcione de manera más intensa en los tejidos tumorales. Uno de ellos está relacionado con el hecho de que las células tumorales tienen una enorme dependencia de las oncoproteínas para su transformación maligna y supervivencia [118], y muchas de las oncoproteínas son clientes de HSP90. Por este motivo, la HSP90 es más necesaria en las células tumorales que las normales. Además,

las oncoproteínas presentan mutaciones, por lo que requieren de más ayuda que sus homólogos sin mutaciones para conseguir una conformación estable, y dependen en mayor medida del funcionamiento de HSP90.

Dentro de las oncoproteínas que son clientes de HSP90 se incluyen algunas que son claves en los seis eventos más destacados e identificativos de la progresión de la enfermedad cancerígena: promover la proliferación celular (ej. B-Raf), ignorar las señales anti-crecimiento (ej. Wee1), evadir la apoptosis (ej. Akt), potenciar la replicación ilimitada (ej. hTERT), promover la angiogénesis (ej. HIF-1, VEGF), e invadir tejidos adyacentes y lejanos (ej. MMP2) [108, 119].

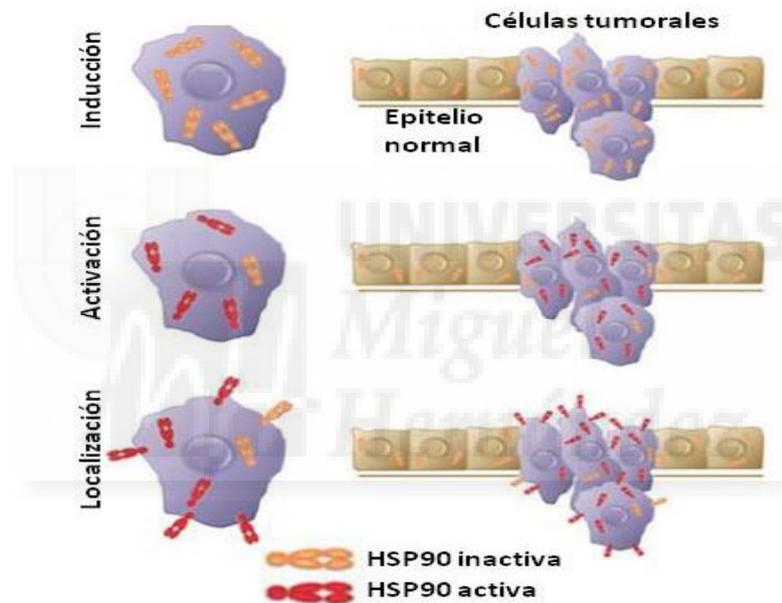


Figura 11: Representación de HSP90 en células sanas y transformadas (imagen tomada de [117]).

5. Rutas de señalización y su relación con HSP90

Existen diversas rutas de señalización o de transducción de señales que cuando reciben un estímulo o una señal extracelular son responsables de desencadenar procesos intracelulares tan importantes como la inducción del crecimiento, la diferenciación celular y la progresión en el ciclo celular, a través de la fosforilación y la modulación de las funciones de multitud de proteínas. Algunas de las rutas más características y estudiadas son la cascada de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (o ruta PI3-K/Akt), y la cascada de las proteínas Ras/Raf/Mek/Erk 1/2 (o ruta MAPK en esta tesis doctoral).

Ambas rutas, PI3-K/Akt y MAPK, son activadas principalmente por receptores celulares de tipo tirosina quinasa (RTK). Estos receptores son proteínas transmembrana que disponen de un dominio tirosina quinasa citoplasmático. La interacción de ligandos extracelulares como factores de crecimiento induce un cambio conformacional del receptor, provocando en la mayoría de los casos la dimerización de receptores y, por interacción receptor-receptor, la fosforilación de residuos de tirosina, que son reconocidos por proteínas intermediarias o adaptadoras que activan e inician diferentes cascadas de señalización intracelular. Algunos de los RTK relacionados con la activación de las rutas PI3-K/Akt y MAPK son los receptores de la familia HER [120]. La familia de receptores HER está formada por cuatro miembros: EGFR (HER-1), HER2 (Neu/ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4), que son capaces de modular multitud de procesos celulares y su desregulación está relacionada con el desarrollo de muchos tipos de tumores [121].

En el caso de la ruta PI3-K/Akt, (Figura 12), cuando se inicia la cascada por un estímulo que provoca la fosforilación de un RTK, el primer paso que se produce es la activación de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K), generando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂). El PIP₃ intercede como intermediario de la activación de numerosos sustratos, entre los que se encuentra la serina/treonina quinasa Akt, también llamada PKB. Esta activación consiste en permitir que Akt se transloque del citoplasma a la membrana plasmática donde puede ser fosforilada por quinasas cercanas (PDK-1 y PDK-2). Una vez que Akt se activa, es capaz de fosforilar o bloquear a multitud de sustratos, entre los que encontramos proteínas implicadas en procesos vitales para las células como la apoptosis, la progresión del ciclo celular, el metabolismo glucídico y la supervivencia [122, 123]. Uno de estos sustratos que se activa por Akt de gran importancia es la serina/treonina quinasa mTOR (diana de rapamicina en células de mamíferos), la cual regula la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de los principales reguladores de la traducción del ARNm y de la síntesis de ribosomas, en respuesta a diferentes estímulos, como factores de crecimiento o nutrientes [124]. Algunas de las funciones de mTOR se efectúan a través de la regulación proteínas que se localizan por debajo de ella, como es el caso de la quinasa p70S6K (o proteína S6K1) [125]. La proteína p70S6K tiene como

Introducción

sustrato principal a la proteína ribosomal S6 (RPS6), que contribuye al control de procesos celulares a través de la traducción selectiva de ARNm concretos.

La ruta MAPK, (Figura 12), formada por la secuencia de proteínas Ras/ Raf/ Mek 1/2/ Erk 1/2 tiene como proteína principal a la quinasa Erk 1/2, y sus proteínas pertenecen a la superfamilia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esta cascada se activa principalmente por medio de los RTK, cuyas tirosinas fosforiladas pueden interactuar con proteínas adaptadoras intracelulares, como Grb2, que se encuentra asociado al intercambiador de nucleótidos de guanina (SOS). Entonces, el complejo Grb2/SOS se transloca y SOS estimula la activación de Ras. Las proteínas Ras son un grupo de proteínas pequeñas con actividad GTPasa, dentro de las que se incluye uno de los miembros más estudiados de esta ruta, Kirsten-Ras (K-Ras). Otros miembros muy conocidos de esta familia son Neuroblastoma-Ras (N-Ras) y Harvey-Ras (H-Ras). Estas proteínas se encuentran unidas a GDP en su estado inactivo. Cuando se produce el cambio de GDP a GTP las proteínas Ras se activan, y gracias a su actividad intrínseca GTPasa, que es estimulada por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), pueden volver a inactivarse [126]. En su estado activo, Ras es capaz de interactuar con numerosos sustratos activándolos, entre los que se encuentra la familia de serina/treonina quinasas llamada Raf (Raf-1 (C-Raf), A-Raf, B-Raf). A continuación, las quinasas Raf pueden activar a otra quinasa llamada Mek 1/2, que es el efector conocido para activar a la última quinasa de la ruta, Erk 1/2. Una vez activa, Erk 1/2 es capaz de modular la actividad de numerosos sustratos, ya sea positiva o negativamente, como por ejemplo proteínas quinasas y fosfatasa, o proteínas relacionadas con apoptosis y con la migración, e incluso regular factores de transcripción, por su capacidad de translocarse al núcleo [127].

Por otro lado, hay que subrayar que las vías de transducción están altamente reguladas, pero aun así, pueden aparecer anomalías en moléculas que forman parte de la cascada o en los ligandos que las activan, y cuando esto ocurre, los procesos que dependen de su correcto funcionamiento, como la proliferación o la apoptosis, se ven alterados. Estas alteraciones son frecuentes en las células cancerígenas, donde las rutas de señalización PI3-K/Akt y MAPK se encuentran anormalmente activadas [128, 129].

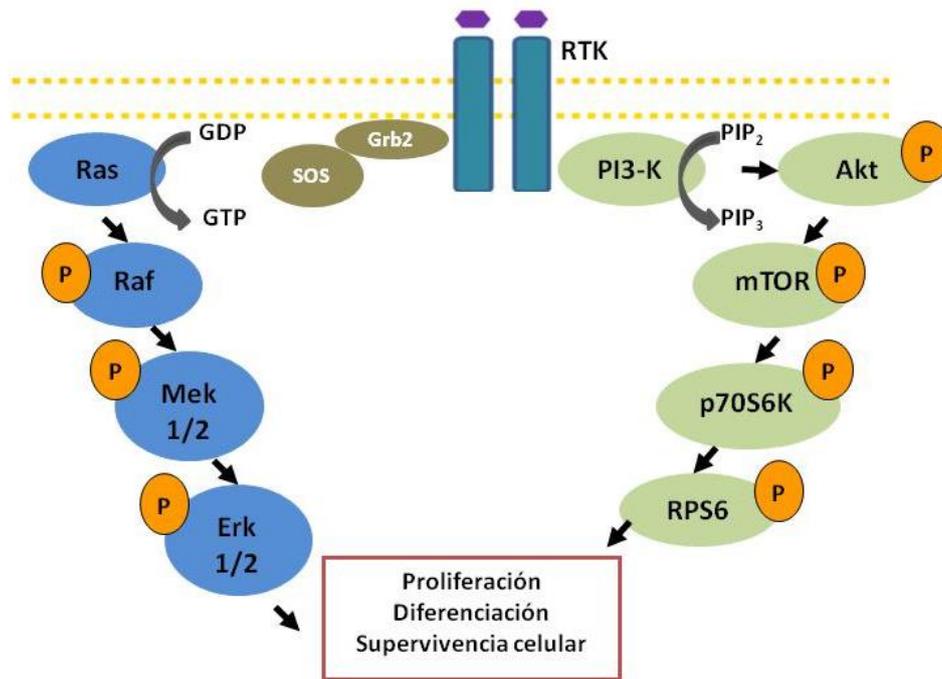


Figura 12: Descripción de las rutas de señalización PI3-K/Akt y MAPK, indicando varios de sus integrantes.

En concreto, en el CP y en el CCR estas rutas son particularmente interesantes por la alta incidencia de mutaciones en el oncogén KRAS que presentan ambos tipos de cáncer, con una frecuencia entre un 80% y un 40% respectivamente, como ya comentamos anteriormente. Esta mutación puede conducir a una activación de las ruta PI3-K/Akt y MAPK [126, 130]. Es por ello que las mutaciones en el oncogén KRAS se relacionan con un peor pronóstico y resistencias a algunas terapias antitumorales. Cuando KRAS está alterado se produce un bloqueo en la actividad GTPasa de la proteína K-Ras, quedando ésta en su forma activa de manera constitutiva.

Junto con KRAS, se han descrito mutaciones en otros oncogenes (gen de EGFR, BRAF, NRAS, PIK3CA, etc.), que aunque son menos frecuentes, participan activando estas rutas de señalización cuando están presentes, y por tanto tienen efectos sobre la proliferación celular y la supervivencia. Por ejemplo, BRAF aparece mutado en el 5-10% de los casos de CCR [131] y aproximadamente en un 15% en el CP [132], manteniendo la ruta MAPK en funcionamiento. La hiperactividad de RKT por amplificación génica o formas mutantes es una alteración frecuente también en diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, EGFR está sobreexpresado tanto en CP como en CCR, en valores comprendidos entre un 25 y un 90% de los tumores analizados [133]. Además, factores

Introducción

de crecimiento como EGF o TGF- α , pueden ser liberados por el estroma y mantener activos constitutivamente a los receptores HER [120].

En conclusión, cuando las vías PI3-K/Akt y MAPK están activadas de forma incontrolada son responsables de la desregulación de distintos procesos celulares, como son el crecimiento celular, la inducción de la apoptosis y la diferenciación celular, entre otros, lo que contribuye a la progresión tumoral, migración, invasión, angiogénesis y metástasis [134, 135].

La chaperona HSP90 tiene un papel clave en ambas rutas, ya que varias de las proteínas localizadas en estas vías de señalización son proteínas clientes de HSP90. En concreto, los clientes de HSP90 presentes en estas rutas son: la familia de receptores HER, capaces de iniciar la activación de ambas rutas, las proteínas quinasas Raf (isoformas B y C), Akt, mTOR y p70S6K. Esto es muy interesante si pensamos en HSP90 como una posible diana terapéutica, ya que inhibiendo su actividad, se verán afectados los clientes que participan en estas rutas, y así se podría atacar simultáneamente ambas rutas y frenar las consecuencias de su desregulación [108].

6. La regulación del ciclo celular y la muerte celular en las células tumorales

En condiciones normales, las células somáticas se dividen para proliferar en momentos en los que el crecimiento es necesario y esta división se realiza dentro del ciclo celular. El ciclo celular tiene como eventos más destacados la replicación del ADN, en la fase de síntesis (S) y la separación de los cromosomas, en la fase de mitosis (M). Entre ambas hay dos periodos de tiempo que las separa, la fase G₁ y G₂. Las células también se pueden encontrar en un estado de reposo o fase G₀, donde no reciben estímulos para dividirse y tienen un ritmo metabólico más lento. Pero si las células reciben las señales apropiadas para el crecimiento, pueden reingresar en la fase G₁, y si estos estímulos continúan, son capaces de superar el punto de restricción de G₁ y progresar hasta finalizar el ciclo celular, dividiéndose en dos células idénticas [136]. Llegado el momento, las células cesan por completo su división.

El ciclo celular es un proceso complejo y su coordinación depende tanto de señales extracelulares y/o intracelulares, como de mecanismos moleculares que regulan

la progresión en las fases del ciclo celular [137]. Los complejos formados por Cdk-ciclina son los reguladores principales del ciclo celular, y están formados por la unión de quinasas serina/treonina dependientes de ciclinas (Cdks) y una ciclina. Las ciclinas controlan la actividad quinasa de las Cdks, y las variaciones en sus niveles de concentración son los responsables del avance de una fase a otra dentro del ciclo celular. Existen cuatro ciclinas (A, B, D y E) que interactúan con diferentes Cdk, dependiendo del momento del ciclo celular. Entre las Cdk, destacamos Cdc2, que fue la primera en conocerse, y por ello es también llamada Cdk1. En términos generales, al inicio de la fase G_1 , las ciclinas de tipo D son las primeras en inducirse, activando y formando complejos con Cdk4 y Cdk6 [138]. Al final de esta fase aumenta la concentración de ciclina E, que forma un complejo con Cdk2 [139]. Durante la fase S, la ciclina E es degradada y comienza a incrementarse la ciclina A, formando un complejo con Cdk2. Por último los complejos necesarios para regular la entrada de S a G_2 , y de G_2 a M, están formados por Cdc2 (Cdk1) y las ciclinas A y B, que son degradadas al finalizar la mitosis [137] (Figura 13).

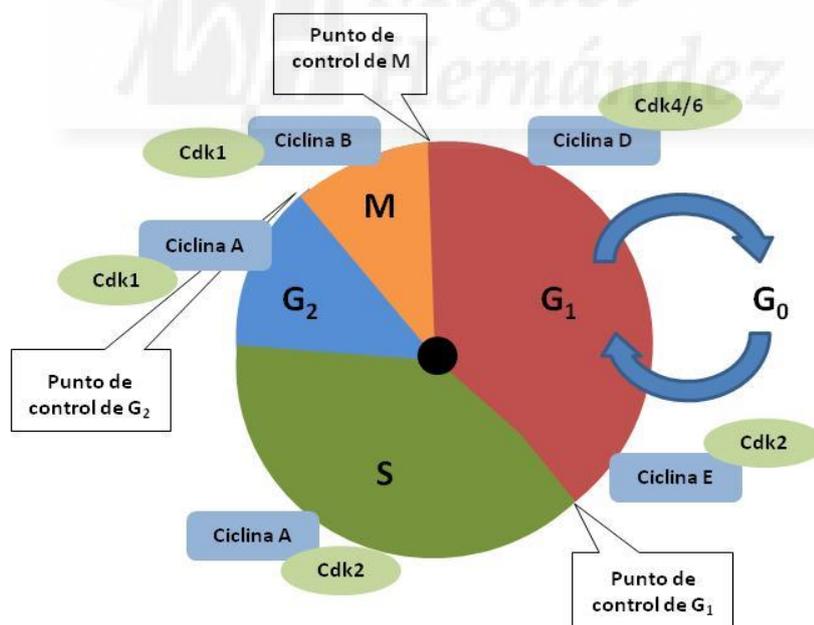


Figura 13: Representación esquemática del ciclo celular de células humanas, con los puntos de parada o control, así como los principales complejos ciclina-Cdk formados en las fases del ciclo celular.

Introducción

Además, las células disponen de puntos de parada o de control ("checkpoint") dentro del ciclo celular (Figura 13). En concreto, estos puntos se localizan en el paso de G_1/S (entrada en S), en G_2/M (entrada en M), y en el final del proceso de mitosis (salida de metafase). La función de estos puntos de control consiste en no dejar que una célula pase a la siguiente fase de ciclo hasta que no haya finalizado la anterior de forma correcta y satisfactoria. Si se detecta alguna anomalía, el ciclo celular puede ser detenido de forma temporal en estos puntos, para una posible reparación de los daños, o de forma definitiva, conduciendo a la célula a la muerte cuando los daños son irreparables. Además existen proteínas encargadas de reprimir el progreso del ciclo celular, como las quinasas inhibitoras de Cdk (CKI), entre las que se encuentran p16 (INK4), p21 (Waf1 o Cip1) o p27 (Kip1), que impiden la actividad de los complejos ciclina-Cdk [140]. Otras proteínas que participan en la regulación del ciclo celular son Retinoblastoma (Rb) y p53. La proteína Rb participa en la entrada de las células en la fase S cuando es fosforilada por los complejos Cdk/ciclina de la fase G_1 , y es susceptible a las señales inhibitorias de crecimiento [141], y la proteína p53 está relacionada con la parada de las células en el punto de control de G_1/S en situaciones de estrés que producen daños en el ADN, ya que puede inducir la expresión de p21 [142].

Al igual que las células proliferan para el mantenimiento de la vida, también son eliminadas cuando han cumplido su función fisiológica y/o ya no son necesarias, de manera que siempre existe un equilibrio dinámico entre las células creadas y las destruidas, conservando la homeostasis celular. Por tanto, tan importante es la regulación de la división celular, como los procesos por los cuales se regula la destrucción de células en los organismos multicelulares o muerte celular programada (MCP). Las células tumorales, en general, se caracterizan tanto por poseer una proliferación descontrolada, como por desarrollar capacidades para escapar de la MCP. Dentro de las vías clásicas de MCP más conocidas y estudiadas se encuentra la apoptosis, que tiene como objetivo controlar el número de células, el tamaño celular, y actuar como un mecanismo de defensa para eliminar aquellas células que presenten anormalidades. La apoptosis origina cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos característicos que conducen a la célula hacia una muerte programada y sin inflamación [143, 144], en contraste con el proceso de necrosis, que se desencadena de forma

accidental a consecuencia de un daño negativo, y se caracteriza por provocar hinchazón celular, dilatación de los organelos citoplasmáticos y una ruptura de la membrana plasmática, produciendo en última instancia una respuesta inflamatoria. Cualquier tipo de muerte celular con estas características también es definida con el término de oncosis, aunque este término es menos utilizado. Tradicionalmente se asoció el concepto de muerte celular programada (MCP) con la apoptosis, y una muerte incontrolada con la necrosis [145] (Figura 14). Pero la dualidad apoptosis/necrosis es un concepto muy general que no es capaz de abarcar la complejidad de los diferentes procesos que pueden darse para eliminar las células que han sufrido algún tipo de daño. Hoy día se está utilizando una nueva nomenclatura para describir procesos que pueden conducir hacia la muerte celular, que incluye términos como paraptosis, catástrofe mitótica, piroptosis, necroptosis o autofagia, entre otros [146]. Por ejemplo, el término necroptosis hace referencia a un mecanismo de muerte regulado, pero con similares características clásicamente asociadas a la necrosis [147]. La autofagia es un proceso normalmente asociado a la supervivencia, pero también tiene un papel en la muerte celular [148] (Figura 14). La catástrofe mitótica es una forma de muerte celular atípica que se produce cuando se detecta algún problema durante la división celular [149], concretamente durante el proceso de mitosis, que conduce a las células a la muerte como consecuencia de fallos en la maquinaria mitótica.

Las diferentes alteraciones que se producen en las células cancerosas conducen a una progresión en el ciclo celular siempre activa, haciendo caso omiso a los puntos de parada de los que dispone una célula normal cuando detecta alguna anomalía, e inhibiendo las señales que indican que el crecimiento se debe frenar. Por consecuencia, las células cancerosas pueden dividirse sin control. Rutas de señalización como las comentadas anteriormente, PI3-K/Akt y MAPK, promueven la progresión del ciclo celular cuando están activadas [150-152], y en el caso de PI3-K/Akt su activación es capaz de bloquear la apoptosis, favoreciendo la supervivencia celular [153]. Por tanto, las células tumorales no sólo se dividen de forma inapropiada, sino que además suelen tener inactivados los mecanismos para una muerte regulada y para la eliminación de células anormales o defectuosas.

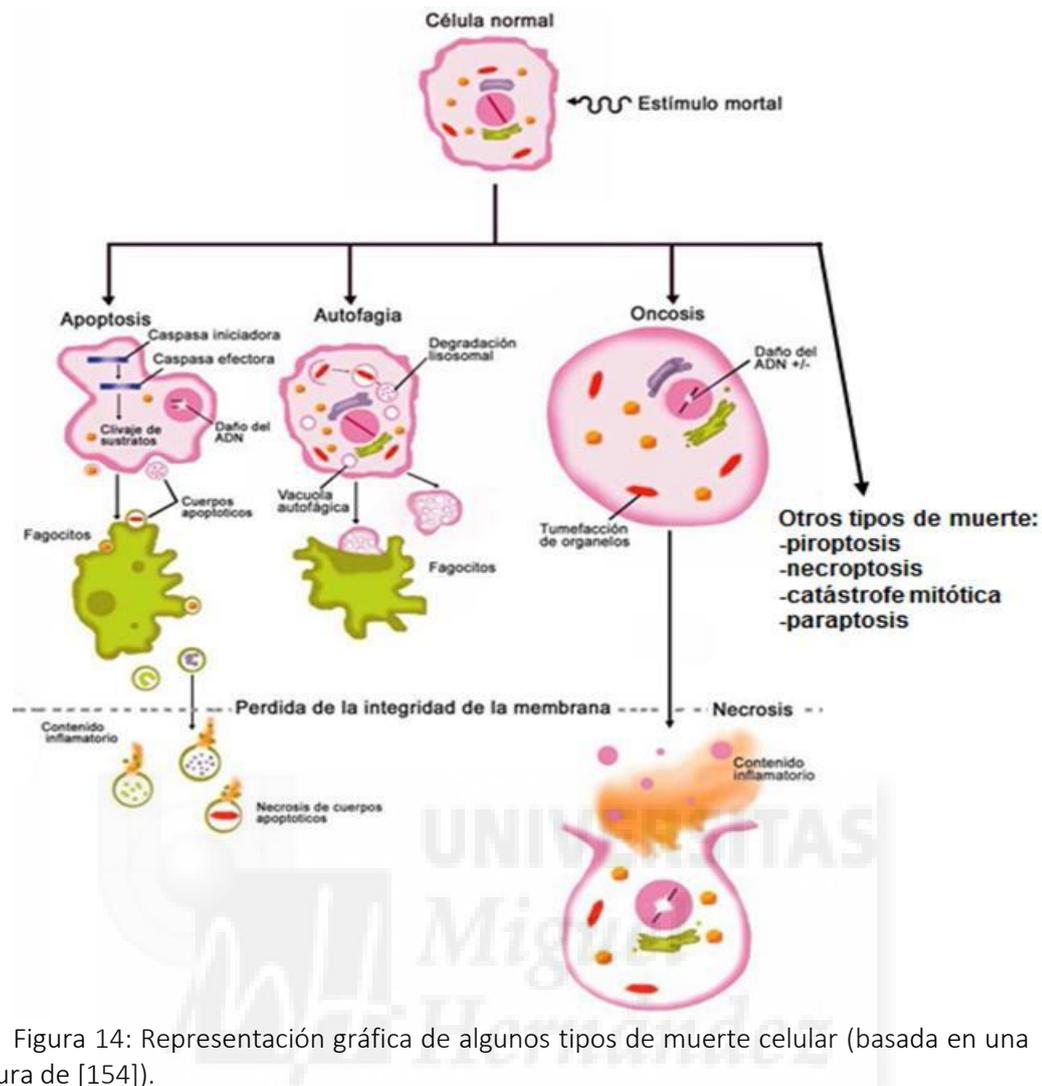


Figura 14: Representación gráfica de algunos tipos de muerte celular (basada en una figura de [154]).

Algunas proteínas clientes de HSP90 son proteínas reguladoras de las fases del ciclo celular y de la división celular, que incluyen ciclinas o Cdks, como la ciclina B1 y Cdc2 (Cdk1), o proteínas como las quinasas Polo-1 (Plk1) o Wee-1, entre otras [155]. De esta forma, HSP90 participa indirectamente en el correcto funcionamiento de la maquinaria del ciclo celular, ya que varias proteínas implicadas en el ciclo celular dependen de ella para activarse, y su inhibición podría ser utilizada como un mecanismo para frenar la proliferación de las células tumorales.

7. Inhibidores de HSP90

En los últimos años, las terapias antitumorales tradicionales y las estrategias de prevención, sin duda alguna han incrementado la supervivencia de los pacientes que sufren cáncer. No obstante, los avances logrados aún no son suficientes en muchos casos y hay una necesidad de mejorar y encontrar terapias realmente eficaces, al

mismo tiempo que se resuelven problemas como la toxicidad secundaria asociada a los tratamientos, y la aparición de recidivas causadas por el desarrollo de quimioresistencias. Todo esto hace que la investigación en la búsqueda de nuevos tratamientos sea necesaria.

Avances en el conocimiento molecular han hecho surgir nuevas modalidades terapéuticas antitumorales, que tienen como objetivo combatir específicamente proteínas alteradas o mal reguladas, llamadas dianas moleculares, que participan en rutas de señalización relacionadas con la proliferación, supervivencia, invasión y metástasis de los tumores [156]. Con este punto de vista, en los últimos años se han desarrollado terapias más eficaces e individualizadas, atendiendo a las características del tumor de cada paciente. Este nuevo modelo farmacológico se conoce como terapia selectiva o "dirigida", y hoy día ya existen en clínica fármacos basados en esta modalidad.

La implicación de las chaperonas en la tumorigénesis, ha hecho que en los últimos años se hayan realizado numerosos trabajos para entender cómo funcionan HSP90 y otras chaperonas (Cdc37/p50, HSP70, etc.), ya que podrían representar objetivos únicos y novedosos como terapia dirigida contra el cáncer. Inicialmente, la inhibición de chaperonas, y en concreto de HSP90 como estrategia terapéutica, supuso algunas reticencias, dado que las células sanas necesitan de las chaperonas para su correcto funcionamiento. Sin embargo, y a pesar de ello, algunos datos corroboran que HSP90 se comporta de forma diferente en las células cancerosas [107, 116, 117], como hemos descrito anteriormente, y finalmente se propuso como diana terapéutica frente al cáncer.

De hecho, multitud de inhibidores de la chaperona HSP90 de diferente naturaleza ya han sido identificados (Tabla 4), y en las últimas dos décadas numerosos trabajos recogen la habilidad de estos inhibidores de disminuir y/o alterar la actividad de HSP90. Todavía ninguno ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), pero se encuentran en vías de desarrollo clínico, siendo objeto de estudio en un número importante de ensayos clínicos. Al igual que otros autores [157, 158], a continuación comentaremos algunos de los logros o fracasos que se han

Introducción

conseguido con algunos de los inhibidores de HSP90, tanto en el laboratorio como en clínica, haciendo hincapié en los compuestos 17-AAG y NVP-AUY922.

De forma simplificada, los inhibidores se unen a las regiones de HSP90 que contienen actividad ATPasa, concretamente en una parte muy conservada de unión a ATP. Estas regiones se localizan en los dominios terminales N y C de HSP90. Solamente son conocidos dos agentes que se unen a la región localizada en el dominio C, el antibiótico novobiocina [159] y el fármaco citotóxico cisplatino [160]. Con el primero la unión es muy débil y necesita de una alta dosificación, y el segundo es un fármaco que se usa por presentar otras propiedades antineoplásicas.

El resto de inhibidores de HSP90 se unen a la región que se encuentra en el dominio N de HSP90. La acción de estos inhibidores impide la unión de ATP y por tanto, el cambio de conformación de HSP90 que se produce por la unión de los dominios N. Así, HSP90 no puede alcanzar su estado maduro o cerrado, lo que le impide realizar su función y acaba conduciendo a las proteínas clientes que se unen a ella hacia el proteosoma, donde son degradadas.

Naturaleza	Clase	Nombre	Adm.
Natural	Ansamicinas	Geldanamicina	-
Semi-sintéticos		17-AAG	IV
		17-DMAG	IV/Oral
		IPI-493 (17-AG)	Oral
		IPI-504	IV
Natural	Resorcinol	Radicol	-
Sintéticos		NVP-AUY922	IV
		Ganestepib (STA-9090)	IV
		AT-13387	IV
		KW-2478	IV
Otros sintéticos	Purinas	BIIB021	Oral
		PU-H71	IV
		MPC-3100	Oral
		CUCD-3050 (Debio 0932)	Oral
	Aminopirimidina	NVP-HSP990	Oral
	Derivados de dihidro-indazolona	SNX-5422 SNX-2112	Oral

Tabla 4: Clasificación de algunos de los inhibidores de HSP90 más destacados.

7.1 Inhibidores ansamicínicos

En 1994 se describió por primera vez cómo un producto natural llamado *Geldanamicina* (GA) inhibía la formación del complejo maduro de HSP90 [161]. GA es un antibiótico ansamicínico producido por *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* var. *nova* [162] que es capaz, entre otras cosas, y al igual que otro antibiótico ansamicínico, herbimicina A, de unirse al dominio N impidiendo el correcto funcionamiento de la chaperona HSP90 [163, 164]. Este antibiótico demostró ser activo tanto *in vitro*, donde degradaba varias oncoproteínas produciendo efectos antiproliferativos en líneas celulares tumorales [165], como *in vivo*, donde mostró actividad antitumoral en modelos preclínicos [166]. Sin embargo, también se observó que producía una alta toxicidad hepática por lo que su desarrollo clínico cesó.

La búsqueda de nuevos inhibidores de HSP90 que pudieran ser utilizados en clínica continuó, y se identificaron varios derivados semi-sintéticos de GA. El cambio de un grupo metoxi por un grupo alilamino en GA dio lugar a una pequeña molécula llamada 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (**17-AAG** o tanespimicina), que fue el primer derivado de GA desarrollado.

En un esfuerzo por desarrollar nuevos inhibidores de HSP90 más ventajosos que los anteriores, una segunda generación de derivados ansamicínicos aparecieron, dando lugar a 17-dimetilaminoetilamino-17-desmetoxygeldanamicina (17-DMAG o alvespimicina) e IPI-504 (clorhidrato de retaspimicina). 17-DMAG surgió con la variación del grupo metoxi de GA por N, N-dimetiletilamina, lo que le proporcionaba buena solubilidad acuosa y biodisponibilidad oral. Además, mostró una potente eficacia antitumoral *in vivo* [167], e incluso fue evaluado en ensayos clínicos de fase I [168]. Pero al igual que sucede con GA, su eficacia va acompañada de diferentes efectos adversos [169], por lo que su uso clínico también quedó descartado. Otro derivado ansamicínico a destacar es el principal metabolito de 17-AAG que se forma *in vivo*, llamado 17-amino-17-demetoxigeldanamicina (17-AG) [170], cuya formulación oral, IPI-493, presenta buena biodisponibilidad y ha tenido una alta efectividad en estudios *in vivo* [171].

Introducción

Los anteriores inhibidores son benzoquinonas ansamicínicas (GA, 17-AAG, 17-DMAG y 17-AG) (Figura 15). Existe otro inhibidor ansamicínico, IPI-504, que es una sal hidroquinona derivada de 17-AAG, muy soluble en agua por lo que no requiere de agentes solubilizantes orgánicos para su administración y no lleva asociada la toxicidad hepática que presentan las benzoquinonas. Este inhibidor ha demostrado ser eficaz tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* para diferentes tipos de tumores [172], y su eficacia ha sido evaluada en varios ensayos clínicos. Como agente único en estudios de fase I fue bien tolerado [173, 174], y en estudios de fase II en tumores de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) tratados previamente con inhibidores de EGFR, ha mostrado actividad antitumoral especialmente en pacientes con reordenamiento del gen ALK [175]. Sin embargo, los resultados obtenidos en otros estudios de fase II realizados en diferentes tipos de tumores han sido muy modestos [176, 177].

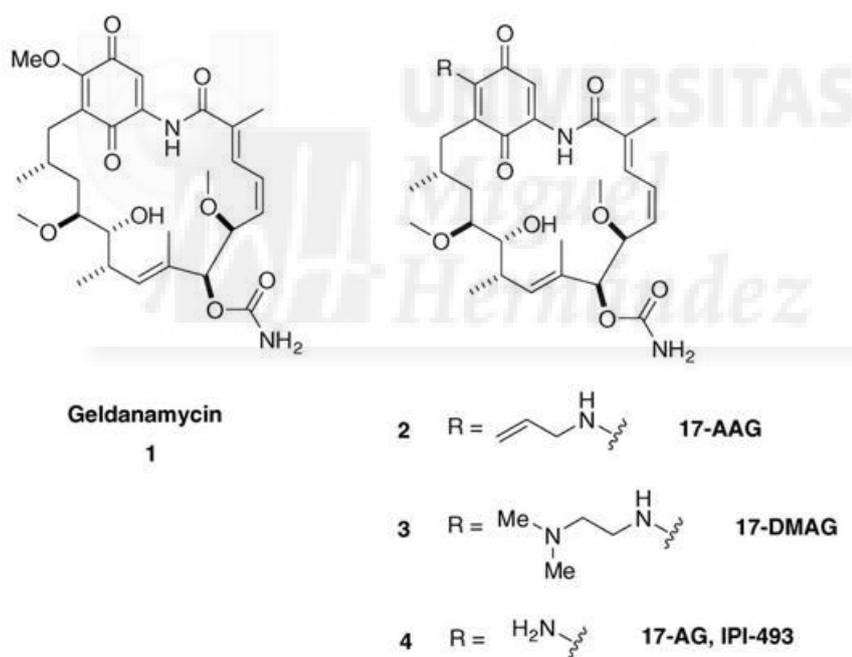


Figura 15: Estructura química de GA y varios de sus derivados ansamicínicos (tomada de [157]).

7.1.1 17-AAG

El fármaco 17-AAG o tanespimicina forma parte del grupo de benzoquinonas ansamicínicas que inhiben la actividad de HSP90. Es el compuesto más estudiado de su grupo como agente antineoplásico, y existe una amplia literatura describiendo los efectos antitumorales de 17-AAG en ensayos *in vitro* e *in vivo* en diferentes tumores:

cáncer de próstata [178], linfoma no-Hodgkin [179], leucemia mieloide [180], mieloma múltiple [181], carcinoma cervical [182] y melanoma [183]. Los resultados favorables en los estudios preclínicos contribuyeron a pronosticarle un futuro prometedor como fármaco antitumoral. A finales de los 90 comenzó a ser evaluado en ensayos clínicos, siendo el primer inhibidor de HSP90 que lo hacía, y durante varios años fue el único. Desde entonces ha sido incluido en multitud de ensayos clínicos con objeto de evaluar sus efectos anticancerígenos para diversos tipos de tumores (mieloma múltiple, melanoma, carcinoma renal, tumores sólidos avanzados, etc.), tanto como agente único, como en combinación con otros fármacos antitumorales [184]. Actualmente, los ensayos clínicos con 17-AAG han finalizado (véase <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=17-AAG>, visitado en marzo de 2014), aunque se siguen publicando resultados de trabajos relacionados con él, y su estudio puede proporcionar una valiosa información sobre cómo actúan los inhibidores de HSP90.

Es posible que su carrera se haya visto frenada, pese a las esperanzas puestas en él, porque los resultados clínicos no han sido tan positivos como se esperaba y ha mostrado una limitada actividad cuando es administrado como agente único. Uno de los posibles motivos de fracaso en los ensayos clínicos puede estar asociado a que las dosis administradas a los pacientes no fueron las óptimas para inhibir las oncoproteínas deseadas. Es el caso del estudio llevado a cabo en pacientes con melanoma tratados con 17-AAG, donde los resultados mostraron que no existía una respuesta objetiva al tratamiento, y aunque la expresión de algunas proteínas como ciclina D1 (proteína cliente de HSP90) se veía afectada, otras con relevancia para la supervivencia del melanoma no sufrieron cambios significativos o fueron de corta duración [185]. La escasa eficacia de 17-AAG también se ha descrito en otros ensayos de fase II, concretamente en ensayos de carcinoma de células renales claras y papilar [186], y en cáncer de próstata metastásico hormono-refractario [187]. En ambos estudios, la inhibición de la actividad biológica de HSP90 duraba poco tiempo, por lo que probablemente las dosis y la forma de administración no fueron lo suficientemente adecuadas.

Además, 17-AAG presenta algunos inconvenientes asociados con las desfavorables propiedades fisicoquímicas que manifiesta: baja solubilidad acuosa y

Introducción

necesidad de utilizar solventes orgánicos para su formulación [188]. Los excipientes orgánicos suelen ser tóxicos y causan reacciones adversas, por lo que limitan la administración clínica de 17-AAG e impiden que los pacientes puedan recibir una dosis tolerada más alta y realmente eficaz. Es el caso del solvente dimetil sulfóxido (DMSO) que provoca náuseas, vómitos y mal olor, e incluso pueden llegar a producir toxicidad hepática y cardíaca. Otra desventaja que manifiesta 17-AAG está relacionada con su precursor (GA), ya que las benzoquinonas ansamicínicas producen problemas hepáticos como efecto secundario, y esta reacción adversa es un efecto dosis-limitante. Se desconoce la razón por la que este tipo de moléculas producen toxicidad hepática, pero se piensa que podría estar relacionada con otros mecanismos diferentes a la interacción con HSP90. En concreto, se ha descrito que las benzoquinonas tienen una reacción química con el grupo tiol del glutatión (GSH). GSH es capaz de conjugarse con algunos productos químicos, y en este caso en concreto, lo hace formando aductos benzoquinona-GSH que impiden el funcionamiento de GSH como agente detoxificante [189]. Esta reacción no se produce de igual modo por todas las benzoquinonas. En el caso de GA y 17-DMAG la reacción es rápida, mientras que con 17-AAG y 17-AG ocurre más lentamente. Esta diferencia explicaría por qué 17-AAG es menos hepatotóxico que otras benzoquinonas.

La acción de 17-AAG también está condicionada por una flavoproteína que se expresa principalmente en el citosol, llamada NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1, DT-diaforasa) [190]. NQO1 es una enzima cuyo mecanismo de acción consiste en reducir a una amplia gama de sustratos a través de la transferencia de dos electrones. Para ello usa un cofactor flavínico (FAD) y un derivado reducido de la nicotinamida, NADH o NADPH, indistintamente, como donador de electrones [191]. La función que clásicamente se ha descrito para NQO1 es su capacidad de metabolizar sustratos quinónicos, que son tóxicos para el organismo, hasta su forma completamente reducida o hidroquinona, protegiendo a las células de la formación de radicales libres y metabolitos tóxicos de oxígeno [192]. Las benzoquinonas ansamicínicas también son sustratos de NQO1, las cuales pueden ser bio-reducidas de quinonas a sus hidroquinonas derivadas.

En concreto, se ha descrito que en condiciones fisiológicas 17-AAG se encuentra en un equilibrio redox dinámico entre su forma quinona, que podemos considerar el fármaco propiamente dicho (17-AAG), y su forma hidroquinona o reducida (17-AAGH₂) [193]. La molécula 17-AAGH₂, o base libre de la hidroquinona, es sensible a los cambios de pH y susceptible de oxidación. Su estabilización gracias a la protonación del nitrógeno en posición 17 dio lugar a una sal derivada, IPI-504, que puede formar 17-AAGH₂ y 17-AAG en condiciones fisiológicas [194]. La forma hidroquinona (17-AAGH₂) no solamente tiene una alta solubilidad acuosa, sino que además ha revelado ser mejor inhibidor de HSP90, ya que es mucho más afín a la chaperona [195, 196].

El equilibrio redox entre 17-AAG y 17-AAGH₂ parece estar mediado por enzimas oxidorreductasas, entre ellas la enzima NQO1, que hacen posible el intercambio reversible entre la forma quinona y su hidroquinona. En condiciones aerobias y a un pH fisiológico la hidroquinona, 17-AAGH₂, puede ser oxidada a quinona otra vez [197], y así sucesivamente (Figura 16).

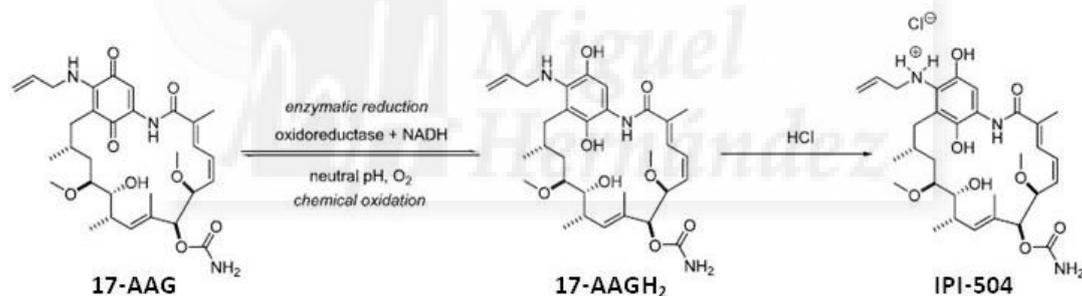


Figura 16: Equilibrio dinámico redox entre 17-AAG y su forma hidroquinona (17-AAGH₂), y la formación de IPI-504. 17-AAG puede sufrir una reducción enzimática dando lugar a 17-AAGH₂. La forma hidroquinona es propensa a oxidarse de nuevo a 17-AAG a pH neutro y condiciones aerobias. La estabilización de la hidroquinona forma la sal derivada IPI-504 (tomada de [198]).

Por último, hay que comentar que la presencia de transportadores de membrana dependientes de ATP o *ATP-binding cassette* (ABC), también pueden suponer un inconveniente para que un fármaco pueda ejercer su actividad, y algunos de ellos se han relacionado con las benzoquinas ansamicínicas [199, 200]. La sobreexpresión de estas proteínas, que participan en el transporte a través de la membrana celular, ha sido puesta de manifiesto en células resistentes a algunas terapias antitumorales. Estos transportadores son capaces de la captación y de la salida

Introducción

de un amplio de sustancias a través de la membrana con un gasto energético y participan en multitud de procesos fisiológicos, incluyendo el transporte de lípidos, aniones orgánicos o medicamentos. Uno de los transportadores más conocidos, es la glicoproteína P (P-gp o Mdr-1), cuya presencia se ha identificado en multitud de tumores y se ha descrito como parte importante del fenómeno conocido como resistencia a múltiples fármacos (MDR) [201]. Otros transportadores frecuentemente asociados a este sistema de resistencia son BCRP1 (o ABCG2) y MRP1 (o ABCC1), cuya expresión también está relacionada con el fenotipo MDR [202, 203].

7.2 Inhibidores derivados del radicol

Existe otro tipo de inhibidores de HSP90 cuya base molecular no está relacionada con las quinonas, pero que también provienen de un antibiótico natural, como la GA. Son los inhibidores derivados del producto natural radicol (Figura 17). El radicol es un antibiótico antifúngico macrocíclico originalmente aislado en el hongo *Monosporium bonorden* [204]. Estructuralmente es diferente a las ansamicinas, pero comparte con ellos su mecanismo de inhibición de HSP90, compitiendo por el lugar de unión del ATP en el dominio N [205]. Este compuesto es capaz de inhibir HSP90 a través de su parte química formada por un alcohol aromático, el resorcinol, que encaja fuertemente en el lugar de unión de ATP, provocando una inhibición irreversible de la chaperona. *In vitro*, ha demostrado ser un gran potente inhibidor de HSP90, pero en animales es poco soluble e inestable, y muestra poca o ninguna actividad. A partir de la estructura química del radicol, varios análogos sintéticos han sido diseñados, intentando superar sus deficiencias [206]. Algunos de ellos son los compuestos oxima derivados de radicol, que han mostrado tener actividad antitumoral *in vivo* [207].

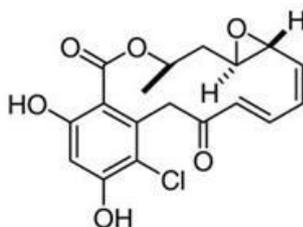


Figura 17: Estructura química de radicol (tomada de [157]).

7.3 Pequeños inhibidores sintéticos

El conocimiento de la estructura de HSP90 ha ayudado a descubrir y a desarrollar, a través del diseño racional, nuevos inhibidores sintéticos de HSP90 viables para el tratamiento del cáncer. Estos inhibidores están basados en diferentes estructuras químicas, pero todos ellos son capaces de unirse a la parte conservada de unión de ATP que se encuentra localizada en el dominio N de HSP90.

Algunos de ellos son moléculas que como el radicicol contienen en su base química resorcinol. En este grupo se encuentran los inhibidores **NVP-AUY922**, KW-2478, ganetespib (STA-9090) y AT-13387. Respecto al primero hablaremos en el siguiente punto, pero quiero apuntar que es un excelente inhibidor de HSP90 y fue el segundo inhibidor de HSP90 sintético en ser utilizado en estudios clínicos. Respecto a los otros, comentar que KW-2478 ha mostrado su eficacia en estudios preclínicos para el tratamiento de mieloma múltiple [208], y ganetespib (STA-9090) también ha revelado resultados positivos en estudios preclínicos para diferentes tipos de tumores, y en ensayos clínicos para tumores sólidos como NSCLC avanzado ha mostrado tener eficacia antitumoral [209, 210]. El inhibidor AT-13387 fue descubierto gracias a una nueva técnica llamada FBDD (siglas de *Fragment-based drug design*), que identifica compuestos químicos pequeños que se unen, de forma débil pero selectiva, a una diana biológica y son optimizados para conseguir fármacos de alta afinidad y selectivos, utilizando técnicas biofísicas [211]. Este último también ha mostrado actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* [212, 213].

Otros compuestos sintéticos pertenecen al grupo de inhibidores fundamentados en una estructura con una base nitrogenada, la purina, y son capaces de emular al ATP y asociarse a su sitio de unión en la chaperona. PU3 fue el primer inhibidor que se diseñó con esta estructura [214], y a partir de su optimización aparecieron otros compuestos con mejores propiedades farmacológicas como BIIB021/CNF2024, PU-H71 y MPC-3100 CDCD-305 (Debio 0932) [158]. El primer inhibidor puramente sintético probado en un ensayo clínico corresponde a esta clase, y fue BIIB021/CNF2024. Esta molécula tiene actividad antitumoral e induce la degradación de proteínas clientes de HSP90 en estudios *in vitro*, e inhibe el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjertos [215]. Además, se han completado ensayos clínicos de fase I y II con este fármaco con

Introducción

resultados positivos [216, 217], y ya existe una segunda generación de compuestos derivados (BIIB028). Respecto a algunos de los otros, comentar que PU-H71 exhibe una potente eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* [218, 219], y CDCD-305 ha mostrado una potente actividad antitumoral en células de NSCLC resistentes a un inhibidor de EGFR [220].

Inhibidores sintéticos con una base química diferente al resorcinol o a la purina también han sido diseñados. Entre ellos se encuentra un compuesto oral llamado NVP-HSP990, que en estudios preclínicos de varios tipos de tumores ha presentado una alta eficacia [221], y compuestos como SNX-5422, pro-fármaco de SNX-2112, obtenido para mejorar la biodisponibilidad oral de su predecesor, que ha demostrado una alta actividad antitumoral en mieloma múltiple y melanoma [222, 223], aunque su estudio un ensayo de fase I en tumores sólidos refractarios y linfomas fue suspendido por los problemas oculares que produjo [224].

7.3.1 NVP-AUY922

A partir de los datos que demostraron que radicicol era un potente inhibidor de HSP90 pero que perdía su eficacia *in vivo*, comenzaron a buscar otros compuestos que superaran esta gran limitación. Así, y a partir del diseño de nuevas moléculas pequeñas con alta afinidad por HSP90, se encontró un compuesto sintético isoxazol-resorcinol llamado NVP-AUY922 [225] (Figura 18). Este ha demostrado un potente efecto antiproliferativo, *in vitro* e *in vivo*, en diferentes tipos de tumores como el de mama, mieloma múltiple o glioblastoma [226-228]. Incluso ha sido probado *ex vivo* contra el cáncer de próstata con resultados positivos [229]. Un estudio reciente describe su potente efecto antitumoral para NSCLC, siendo capaz de inhibir la proliferación de las líneas celulares estudiadas y estabilizar el crecimiento del tumor en los xenoinjertos [230].

Por el momento, NVP-AUY922 es uno de inhibidores de HSP90 con mejores resultados observados en estudios preclínicos, y además, no presenta los inconvenientes que muestran las benzoquinonas ansamicínicas. Su desarrollo clínico no se ha hecho esperar, y ya ha concluido un ensayo clínico de fase I como agente único para tumores sólidos avanzados, donde se estableció su dosis tolerable para ser

utilizada en ensayos de fase II para cáncer de mama HER2 positivos, gástrico y NSCLC [231]. En la actualidad, NVP-AUY922 está siendo evaluado en numerosos ensayos clínicos, que están activos, en fase de reclutamiento o ya finalizados (véase <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AUY922>, visitado en marzo de 2014).

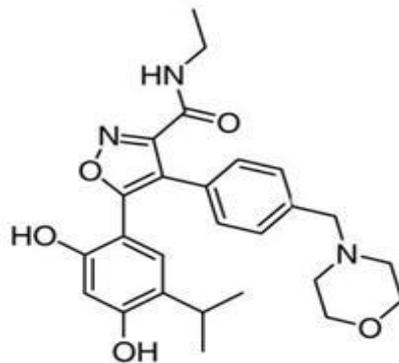


Figura 18: Estructura química de NVP-AUY922 (tomada de [157]).

7.4 Terapias combinadas

El avance en el conocimiento de la enfermedad cancerígena ha conseguido que los tratamientos utilizados en clínica cada vez sean más eficaces y selectivos. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de los tumores acumulen numerosas alteraciones malignas, hace que tengan una gran heterogeneidad bioquímica y que muchos de ellos muestren grandes diferencias de sensibilidad hacia un mismo tratamiento. Esto provoca muchas veces que un sólo fármaco tenga una limitada capacidad de acción sobre un tumor. Siguiendo este enfoque, es razonable pensar que la utilización de varios agentes farmacológicos para combatir un tumor puede representar una mejora en los efectos terapéuticos conseguidos, frente a la utilización de un sólo agente. Por otro lado, el éxito de la combinación farmacológica también depende de que sean bien tolerados por el paciente; es decir, que puedan ser administrados conjuntamente a dosis efectivas sin producir toxicidades graves, dado que la administración de más fármacos puede incrementar los efectos secundarios.

Del mismo modo, las terapias farmacológicas combinadas pueden ofrecer una oportunidad terapéutica para aquellos pacientes que no responden bien a los tratamientos convencionales o que desarrollan quimiorresistencias (tumores

Introducción

refractarios), o para aquellos pacientes en los que la enfermedad vuelve a aparecer, tras haber sido tratados (tumores recurrentes/recidivantes).

Los inhibidores de HSP90 han sido incluidos en varios ensayos clínicos con otros fármacos antineoplásicos, en los que se ha podido evaluar si existía actividad sinérgica entre ellos, y si los resultados antitumorales mejoraban. Los inhibidores de HSP90 impiden a las células cancerosas protegerse de la situación estresante que produce la quimioterapia. Esto puede sensibilizar a las células cancerosas a otros tratamientos antineoplásicos, y se suma al propio efecto antitumoral del inhibidor, por lo que su estudio puede ser muy interesante. Del mismo modo, los inhibidores de HSP90 también pueden colaborar con fármacos con dianas moleculares específicas. Cuando una ruta de señalización se inhibe, las células tumorales pueden escapar a este problema porque tienen activadas otras rutas, e incluso la misma ruta en un punto diferente, por lo que la inhibición de varias dianas moleculares al mismo tiempo puede ser bastante beneficiosa.

En concreto, 17-AAG ha sido estudiado en algunos ensayos clínicos junto con otros quimioterápicos tradicionales, y nuevos fármacos "dirigidos", con una diana molecular concreta, y vamos a comentar algunos de ellos. Cuando se combinó con un inhibidor específico de HER2, trastuzumab, y un inhibidor de proteosoma, bortezomib, los resultados obtenidos fueron muy positivos. La combinación 17-AAG/trastuzumab resultó ser eficaz, de forma tolerable y segura, para los pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivos [232, 233], representando uno de los mayores logros conseguidos en clínica utilizando a HSP90 como diana farmacológica, probablemente a consecuencia de la inhibición sinérgica que producen ambos compuestos sobre HER2. En el estudio realizado con 17-AAG/bortezomib se encontró una mejor respuesta de los pacientes con mieloma múltiple refractario a la combinación, que cuando se administra bortezomib como agente único [234]. Además de la inhibición de HSP90, en este estudio se observó un efecto neuroprotector producido por 17-AAG muy interesante, dado que bortezomib suele provocar neuropatías periféricas como efecto secundario.

17-AAG también ha demostrado eficacia clínica en cáncer renal metastásico y melanoma en estudios de fase I en combinación con sorafenib. Sorafenib es otra novedosa molécula pequeña inhibidora multiquinasa [235].

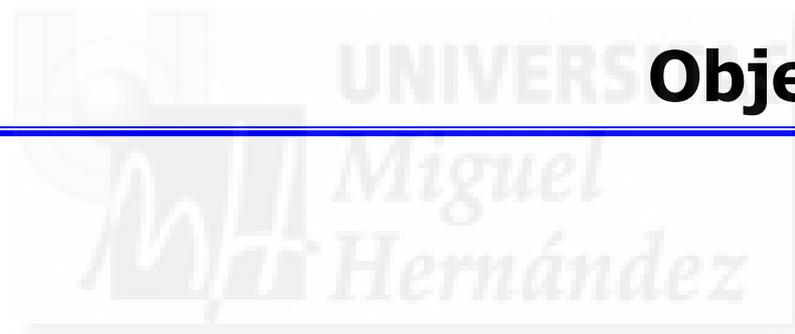
La combinación de 17-AAG con fármacos citotóxicos clásicos también ha sido muy estudiada. Por ejemplo, 17-AAG/irinotecan ha sido administrada en pacientes con tumores sólidos con aceptable toxicidad en un estudio de fase I [236]. También se ha probado la combinación de 17-AAG con dos taxanos, paclitaxel y docetaxel. Con 17-AAG/paclitaxel se obtuvo una actividad sinérgica muy prometedora en estudios preclínicos con líneas celulares de cáncer de ovario [237] y de cáncer de pulmón [238], por lo que se decidió probar la combinación en clínica, concretamente en pacientes con tumores sólidos refractarios a la terapia estándar, pero los resultados fueron muy moderados [239]. El limitado efecto que mostró 17-AAG/paclitaxel se puede atribuir en parte al hecho de que ambos sean prácticamente insolubles en agua, por lo que necesitan de solventes orgánicos que condicionan la dosis de administración. Posteriormente, se decidió poner a prueba esta combinación farmacológica cambiando los excipientes tradicionales tóxicos por nanopartículas formadas por co-polímeros anfifílicos, en las que el fármaco hidrofóbico se haya encapsulado en el interior de una micela. Esta nueva formulación mejoró significativamente la eficacia antitumoral de 17-AAG/paclitaxel en un modelo de ratón de cáncer de ovario humano [240]. Todo lo contrario pasó con la utilización de 17-AAG/docetaxel, que prácticamente no presentó beneficio alguno en tumores sólidos [241].

Otra combinación que tampoco ha funcionado bien ha sido 17-AAG/gemcitabina (GEM), ya que los datos obtenidos mostraron una limitada actividad antitumoral [242]. A esta combinación también le fue sumado un tercer fármaco alquilante de ADN, cisplatino. Estudios preclínicos sugerían posibles resultados positivos de esta triple combinación, pero la toxicidad hematológica que se produjo cuando se aumentaba la dosis administrada para alcanzar la actividad antitumoral, demostró que no era clínicamente aceptable, e incluso que la combinación 17-AAG/cisplatino tampoco alcanzaría dosis efectivas sin producir esa misma toxicidad, por lo que también se descartó para futuros ensayos [243].

Introducción

Del mismo modo, aunque todavía no hay mucha literatura al respecto, NVP-AUY922 está siendo evaluado en ensayos clínicos en combinación con otros fármacos. Los resultados positivos en un estudio previo *in vitro* e *in vivo* en cáncer de mama y gástrico, avalan la utilización de la combinación NVP-AUY922/trastuzumab en ensayos clínicos para estos tumores. Esta combinación fue capaz de producir un efecto sinérgico en modelos resistentes a trastuzumab, y en concreto, en un modelo de cáncer gástrico, el efecto antitumoral de la combinación superó el producido por cualquier otro fármaco [244]. Otro estudio pre-clínico de NVP-AUY922 en NSCLC ha dado pie a iniciar un ensayo clínico junto con pemetrexed, un citotóxico antimetabolito que interfiere en la síntesis de ADN y ARN [230].





Objetivos

Tras lo comentado sobre la chaperona HSP90 y los efectos que ocasionan los inhibidores de HSP90 en las células tumorales, nos planteamos si la inhibición de esta chaperona podría ser un tratamiento farmacológico eficaz contra el cáncer de páncreas exocrino y al cáncer de colon y recto. Siguiendo esta hipótesis, el principal objetivo de este trabajo consistió en investigar la inhibición de la función de la chaperona HSP90 como posible tratamiento antitumoral frente al cáncer de páncreas exocrino y al cáncer colorrectal en modelos celulares *in vitro*.

Para ello, se evaluó el efecto de dos inhibidores específicos de HSP90 de diferente naturaleza, 17-AAG y NVP-AUY922, en un panel de líneas celulares humanas de adenocarcinoma de páncreas exocrino y de carcinoma colorrectal, y en cultivos primarios obtenidos a partir de muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal, por medio de los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la capacidad antiproliferativa de 17-AAG y NVP-AUY922.
- Estudiar el efecto tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 sobre proteínas que forman parte de las rutas de señalización PI3-K/Akt y MAPK.
- Explorar los efectos que producen los inhibidores 17-AAG y NVP-AUY922 a nivel de ciclo celular y de muerte celular.
- Explorar si la enzima NQO1 o los transportadores ABC pueden influir en la respuesta de las líneas celulares al tratamiento con dichos inhibidores.
- Estudiar el efecto de la combinación del inhibidor de HSP90 NVP-AUY922 con otros fármacos antitumorales.

Materiales y Métodos



1. Cultivo Celular

1.1 Líneas celulares

Para este estudio se han utilizado dos paneles de líneas celulares tumorales humanas. El primero incluye ocho líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino (CP) y el segundo diez líneas de carcinoma colorrectal (CCR). Todas las líneas celulares fueron analizadas para descartar la presencia de *Mycoplasma* con el kit VenorGeM (Minerva Biolabs®).

Las distintas líneas celulares de CP empleadas fueron amablemente cedidas por el Dr. Francisco X. Real (Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM) y se describen a continuación (Tabla 5).

Línea celular	Origen
IMIM-PC-2	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas exocrino
IMIM-PC-1	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas
BxPC-3	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas
CFPAC-1	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas ductal derivada de metástasis de hígado
HPAF-II	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas derivada de fluido ascítico
PANC-1	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas
RWP-1	Línea celular de adenocarcinoma de páncreas derivada de metástasis de hígado
Hs 766T	Línea celular de carcinoma de páncreas derivada de metástasis en nódulo linfático

Tabla 5: Nombre y descripción de las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino (CP).

Por otro lado, las líneas de CCR seleccionadas para nuestro estudio proceden de la American Type Culture Collection (ATCC), a excepción de la línea celular HGUE-C-1 que fue obtenida y donada a nuestro laboratorio por el Dr. Miguel Saceda (Hospital General Universitario de Elche, HGUE) (Tabla 6).

Línea Celular	Origen
DLD-1	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
HCT-15	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
HT-29	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
SW620	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal derivada de metástasis en nódulo linfático
SW480	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
HCT 116	Línea celular de carcinoma colorrectal
LoVo	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal derivada de metástasis en la región supraclavicular izquierda
Ls 174T	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
HGUE-C-1	Línea celular procedente de fluido ascítico de un adenocarcinoma colorrectal

Tabla 6: Nombre y origen de las líneas celulares de CCR.

Como controles positivos para la realización de algunos experimentos hemos utilizado otras líneas celulares tumorales humanas (Tabla 7), todas ellas procedentes de la ATCC.

Línea Celular	Origen
Colo 320	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
T98G	Línea celular de glioblastoma multiforme

Tabla 7: Nombre y origen de otras líneas celulares utilizadas como controles positivos.

1.2 Condiciones de cultivo

La manipulación de las líneas celulares se realizó en una cabina estéril de flujo laminar vertical de seguridad biológica tipo II. Las células se mantuvieron a 37°C y en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% dentro de un incubador. El medio de cultivo empleado para todas las líneas celulares fue DMEM rico en glucosa (4,5 g/L) (siglas de Dulbecco's Modified Eagle's Medium), excepto en el cultivo de las líneas celulares BxPC-3 y DLD-1, para las que se utilizó medio RPMI-1640 (siglas de Roswell Park Memorial Institute). Ambos medios contenían L-glutamina estable y se suplementaron con piruvato sódico a una concentración final de 1 mM, HEPES (Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico) a una concentración final de 10 mM, 10% de suero fetal bovino (SBF), previamente inactivado a 56° durante 45 minutos, y

antibióticos (50 U/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomina). Todos los productos utilizados para el cultivo celular fueron fabricados por los Laboratorios PAA®.

1.3 Cultivos primarios

Dentro del proyecto de Investigación Traslacional que se lleva a cabo en nuestro laboratorio, se obtuvieron cultivos primarios de muestras tumorales de pacientes con CCR. Los pacientes fueron operados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA, Murcia) y en el Hospital Universitario Santa Lucía (HUSL, Cartagena), y previamente fueron informados del estudio para el que, desinteresadamente, mostraron su consentimiento. La recogida de las muestras quirúrgicas en el HCUVA se realizó con la utilización del sistema Tissue SAFE (Milestone Srl.), que mantiene las muestras de los tumores extirpados por el Servicio de Cirugía envasadas al vacío y en fresco. Las muestras envasadas fueron enviadas al Servicio de Anatomía Patológica, donde una parte del tejido seccionado por el patólogo se almacenó en el Biobanco del HCUVA, y otra parte fue cedida a nuestro laboratorio por el Servicio de Anatomía Patológica, la cual se destinó a la obtención y desarrollo de cultivos primarios. En el caso de las muestras quirúrgicas recogidas en el HUSL, la parte de la muestra tumoral cedida por el Servicio de Anatomía Patológica para investigación se mantuvo en hielo y se envió a nuestro laboratorio para su procesamiento.

Todo el proceso fue revisado y aceptado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HCUVA, y fue posible gracias a la colaboración de los Servicios de Digestivo, Cirugía, Oncología Médica, Anatomía Patológica del HCUVA y HUSL, y del Biobanco del HCUVA. Los cultivos primarios derivados de las muestras tumorales fueron nombrados con las siglas HCUVA, seguidas de las iniciales CC, que hacen referencia a su procedencia de tumores de CCR, y un número que indica el orden de llegada al laboratorio. Algunos cultivos presentan un superíndice con las siglas CT, para señalar las muestras que fueron enviadas a nuestro laboratorio desde el HUSL. Este sistema garantiza el anonimato de las muestras. Los cultivos primarios analizados en este trabajo provienen de diferentes muestras tumorales de pacientes con CCR y se describen en la Tabla 8 y Tabla 9.

Nombre	Origen	Edad	Sexo
HCUVA-CC-1	Anónimo (primera muestra recogida en la Unidad AECC)	--	--
HCUVA-CC-2	Anónimo (segunda muestra recogida en la Unidad AECC)	--	--
HCUVA-CC-10	Muestra tumoral de ciego	--	--
HCUVA-CC-14	Muestra tumoral de colon izquierdo (sigma)	--	Mujer
HCUVA-CC-34	Muestra tumoral de colon derecho con metástasis en ganglio e hígado	67 a.	Varón
HCUVA-CC-45	Muestra tumoral de colon izquierdo (sigma)	59 a.	Mujer
HCUVA-CC-56	Muestra tumoral de ciego	68 a.	Varón
HCUVA-CC-58	Muestra tumoral de colon izquierdo	44 a.	Varón
HCUVA-CC-60	Muestra tumoral de recto	--	Varón
HCUVA-CC-62	Muestra tumoral de colon izquierdo (sigma)	65 a.	Varón
HCUVA-CC-63	Muestra tumoral de ciego	81 a.	Varón
HCUVA-CC-66	Adenocarcinoma de colon izquierdo (sigma)	75 a.	Varón
HCUVA-CC-70	Muestra tumoral de colon izquierdo	48 a.	Varón
HCUVA-CC-71	Muestra tumoral de recto	85 a.	Varón
HCUVA-CC-1 ^{CT}	Muestra tumoral tipo serrado de colon derecho	81 a.	Varón
HCUVA-CC-3 ^{CT}	Muestra tumoral tipo MSI-H de ciego	69 a.	Varón

Tabla 8: Nomenclatura y procedencia de los cultivos primarios utilizados. También se incluye la edad (años (a.)) y el sexo de los pacientes con CCR que donaron las muestras tumorales.

Cultivo	Abre.	Estadio	Metástasis	Tratamiento previo
HCUVA-CC-34	CC-34	IV	SI	5-FU/LV, IRI
HCUVA-CC-1 ^{CT}	CC-1 ^{CT}	II	NO	Sin tratamiento
HCUVA-CC-3 ^{CT}	CC-3 ^{CT}	III	NO	Sin tratamiento

Tabla 9: Características y abreviatura (Abre.) de algunas de las muestras tumorales donadas por los pacientes con CCR a partir de las que se han obtenido los cultivos primarios.

Los cultivos primarios se establecieron a partir del procedimiento que a continuación se detalla: la muestra tumoral facilitada a nuestro laboratorio, a través del Biobanco del HCUVA o por el Servicio de Anatomía Patológica del HUSL, fue previamente lavada con tampón fosfato salino (PBS), suplementado con antibióticos (200 U/ml de penicilina, 200 mg/ml de estreptomina, 2,5 µg/mL de anfotericina B y 50 µg/mL de gentamicina), y conservado en medio de cultivo DMEM/Ham's F12 (Laboratorios PAA[®]) hasta su procesamiento. Para su disgregación, el material se cortó

en fragmentos de un tamaño no superior a 2-3 cm con un bisturí quirúrgico, en una cabina estéril de flujo laminar vertical de seguridad biológica tipo II. Posteriormente, los fragmentos obtenidos fueron digeridos con un medio enzimático compuesto por: 1,5 U/ml de dispasa (Gibco®, Life Technologies) 0,09 mg/ml de colagenasa II (Sigma Aldrich®), 0,1 mg/ml de pronasa E (Sigma Aldrich®) y 45 U/ml de hialuronidasa (Calbiochem®), en un baño mediante agitación a 37°C durante 30-45 min, para degradar la matriz extracelular. A continuación, los fragmentos digeridos fueron filtrados a través de un filtro con tamaño de poro de 70 micras (BD Falcon™, Becton, Dickinson and Company), y el filtrado fue centrifugado a 200 x g durante 5 minutos. El pellet obtenido fue lavado con PBS suplementado con antibióticos y centrifugado de nuevo en las mismas condiciones. A continuación, el pellet obtenido fue disuelto en un tampón de lisis de hematíes (RL Buffer Lysis, GeneAll Biotechnology) en una proporción 3:1 (v/v) con PBS durante 10 min.

Tras la lisis, la muestra fue centrifugada y lavada con PBS suplementado con antibióticos de nuevo, y el pellet obtenido fue disuelto en medio de cultivo DMEM/Ham's F12 (Laboratorios PAA®). Este medio contenía L-glutamina estable y fue suplementado con un 20% de SBF, previamente inactivado, una solución que contenía insulina (0,01 mg/ml)-transferrina (5,5 µg/ml)-selenio (6,7 ng/ml) (Solución ITS, SERVA Electrophoresis GmbH), 0,5 µg/mL de hidrocortisona (Sigma Aldrich®), 20 ng/ml de EGFR (Sigma Aldrich®), 1 mM de piruvato sódico, 10 mM de HEPES, y varios antibióticos (200 U/ml de penicilina, 200 mg/ml de estreptomina, 2,5 µg/mL de anfotericina B y 50 µg/mL de gentamicina). A continuación, la muestra fue sembrada en frascos de cultivo o placas de BD Primaria™ (Becton, Dickinson and Company) e incubada en las mismas condiciones que las líneas celulares, a 37°C y en atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, dentro de un incubador reservado para cultivos primarios, para evitar posibles contaminaciones. Transcurridas 24-48 horas de cultivo, el medio de cultivo DMEM/Ham's F12 fue reemplazado por "medio condicionado", y a partir de este momento los cultivos primarios se cultivaron con este medio. El "medio condicionado" se obtuvo recogiendo el medio de las líneas celulares de CCR cultivadas en nuestro laboratorio antes de ser tripsinizadas. El medio recogido fue filtrado con una unidad de

filtración estéril para eliminar la posible presencia de células, y suplementado de igual modo que el medio DMEM/Ham's F12, a excepción de los antibióticos que en este caso fueron solamente 50 U/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomicina.

1. 4 Reactivos utilizados

Los reactivos (fármacos) utilizados en este trabajo para tratar las líneas celulares tumorales y los cultivos primarios, para la realización de los experimentos se recogen en la siguiente tabla (Tabla 10). Todos ellos fueron obtenidos comercialmente en estado sólido, y para cada uno fue calculada la cantidad de su disolvente apropiado (vehículo), según la información suministrada por el laboratorio fabricante, para la elaboración de una solución madre o "stock". A partir de cada una de las soluciones madres se obtuvieron el resto de disoluciones empleadas en los experimentos. Los disolventes empleados fueron dimetil-sulfóxido (DMSO, Panreac Química) y agua (H₂O, agua ultrapura Milli-Q®).

Reactivo	Laboratorio	Solución stock	Disolvente
17-AAG	ChemieTek	10 mM	DMSO
NVP-AUY922 (NVP)	ChemieTek	10 mM	DMSO
ES 936	Tocris Bioscience	10 mM	DMSO
Afidicolina	Sigma Aldrich®	1 mg/mL	DMSO
Gemcitabina (GEM)	Tocris Bioscience	10 mM	H ₂ O
Oxaliplatino (OXA)	Sigma Aldrich®	50 mM	DMSO
AZD-6244 (AZD)	ChemieTek	10 mM	DMSO
NVP-BEZ235 (BEZ)	ChemieTek	10 mM	DMSO

Tabla 10: Descripción de los reactivos utilizados.

2. Estudio de la viabilidad celular

2.1 Ensayos dosis-respuesta

Para realizar los ensayos dosis-respuesta se utilizó un ensayo colorimétrico basado en el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este método es capaz de cuantificar la viabilidad celular a través de la reducción del reactivo MTT por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. El reactivo MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que cuando es reducido origina un compuesto insoluble de color púrpura llamado formazán. La cantidad de formazán

obtenido está relacionado con el número de células viables, ya que será proporcional a la cantidad de MTT metabolizado, y puede ser fácilmente determinado en un espectrofotómetro.

Los experimentos se iniciaron con la siembra de las células en placas de fondo plano de 96 pocillos y dejándolas crecer durante 24 horas. La densidad celular en la siembra estaba comprendida entre 1.500 células y 2.500 células por pocillo, dependiendo de la velocidad de proliferación de cada una de las líneas celulares, de manera que las líneas que crecen más rápidamente fueron sembradas en menor proporción, y viceversa. Trascurrido este tiempo, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de fármaco, y el tratamiento se prolongó durante 72 horas. Cada una de las diferentes concentraciones se dispuso por sextuplicado, y en al menos doce pocillos por placa se añadió el disolvente empleado para cada fármaco (células sin tratamiento o control). Pasadas las 72 horas, se añadió en todos los pocillos el reactivo MTT (Sigma Aldrich®), a una concentración de 0,25 mg/mL, y se incubó durante 3-4 horas a 37°C y 5% de CO₂, permitiendo a las células vivas metabolizar el reactivo MTT. Trascurridas este tiempo, se aspiró el medio de los pocillos con una bomba de vacío, y se añadieron 200 µL de DMSO (Panreac Química) a cada uno, para disolver los cristales de formazán de cada pocillo. A continuación, las placas se agitaron vigorosamente durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital para facilitar la disolución del formazán y obtener una coloración homogénea. Por último, se midió la absorbancia de todos los pocillos a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Infinite® M200PRO NanoQuant, Tecan Group)

La sensibilidad de las líneas celulares a los diferentes fármacos se determinó analizando la diferencia de la absorbancia entre las células sin tratar (control) y las células tratadas para cada concentración de fármaco utilizada. En el caso de los cultivos primarios, se utilizó la técnica de tinción con cristal violeta para el estudio de la viabilidad celular, cuya metodología se explica en el apartado siguiente. Además, la tinción con este colorante también fue empleado en líneas celulares tumorales en otro tipo de ensayos.

2.2 Ensayos durante un curso temporal

Para analizar la viabilidad de las células durante un curso temporal de 1, 3 y 6 días se eligió la técnica de tinción con cristal violeta (violeta de metilo). Esta técnica se basa en la capacidad que tiene este colorante de fijarse a los núcleos celulares, de forma que se puede asociar la cantidad de cristal violeta fijado con el número de células viables, y su procedimiento se detalla a continuación.

Para la realización del curso temporal las células se sembraron en varias placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 1.200-2.000 células por pocillo. A cada placa se le asignó un tiempo de incubación: se dispuso de una placa para el tiempo 0 (24 horas de crecimiento), tiempo 1 (un día de tratamiento con el fármaco), tiempo 3 (tres días de tratamiento con el fármaco) y el tiempo 6 (seis días de tratamiento con el fármaco). Transcurrido el tiempo 0, las líneas celulares fueron tratadas con disolvente (células control) o con una única concentración de fármaco, ambos por sextuplicado. Pasado el tiempo correspondiente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con una solución de formaldehído al 4% (AppliChem GmbH) y se tiñeron con 0,05% de cristal violeta (Sigma Aldrich®) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, las células fueron lavadas tres veces con agua destilada, y los pocillos se dejaron secar completamente durante al menos 30 minutos. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 μ L de HCl 0,1 M (Panreac Química) para decolorar los núcleos y se homogenizó entre 3 y 4 veces, lo que produjo una coloración azul homogénea cuya absorbancia se determinó a 620 nm en un espectrofotómetro de placas (Infinite® M200 PRO NanoQuant, Grupo Tecan).

La sensibilidad de las células a los fármacos se determinó teniendo en cuenta la diferencia de absorbancia entre las células sin tratar (control) y las células tratadas para un tiempo determinado; es decir, fueron comparadas con sus respectivos controles (se dispuso un control para cada tiempo: 1, 3 y 6 días, y al promedio de cada control se le asignó el 100% de la proliferación).

2.3 Ensayos de combinación de fármacos

Para clasificar el efecto que produce la combinación de fármacos, se utilizó el modelo teórico Bliss [245]. Este modelo teórico se fundamenta en una teoría

farmacodinámica y permite analizar si la naturaleza de la interacción entre dos fármacos es aditiva, sinérgica o antagónica. Para ello, este modelo calcula una curva teórica (BLISS), a partir de la ecuación $E_{bliss} = EA + EB - EA * EB$. En esta ecuación, EA y EB representa el efecto de los fármacos A y B cuando son utilizados como agentes únicos a una concentración en concreto, y expresa la inhibición que producen estos fármacos en el crecimiento celular reflejada entre los valores 0 y 1. El valor E_{bliss} calcula la fracción de inhibición que producen los fármacos A y B si sus efectos se suman. Cuando se realiza el ensayo se obtiene una curva (EXP) que representa los valores de la fracción de inhibición de crecimiento que produce la combinación de los fármacos A y B experimentalmente, utilizando unas concentraciones concretas. Cuando el valor de la inhibición teórica (BLISS) coincide con el valor de inhibición experimental (EXP) obtenido por el efecto de ambos fármacos, se considera que estos fármacos son aditivos, y cada uno tiene un efecto farmacológico independiente del otro. Sin embargo, cuando el valor de inhibición EXP es superior al valor BLISS, se considera que el efecto que producen ambos fármacos es sinérgico. Por el contrario, si el valor EXP es inferior al valor BLISS se considera que el efecto de los fármacos es antagónico.

En nuestro estudio, el análisis de la combinación de fármacos se realizó mediante la siembra de las células en placas de 96 pocillos, que tras 24 horas de cultivo fueron tratadas durante 72 horas con concentraciones nanomolares de NVP-AUY922 (fármaco B), y diferentes concentraciones crecientes de los fármacos A: gemcitabina (GEM), oxaliplatino (OXA), AZD-6244 (AZD) y NVP-BEZ235 (BEZ). El efecto sobre la viabilidad celular producido por cada uno de los fármacos A fue determinado añadiendo el fármaco sólo o en combinación con el fármaco B, en diferentes líneas celulares. Los datos de la curva BLISS se calcularon utilizando la ecuación mencionada anteriormente para cada punto de la curva dosis-respuesta, con los datos de los fármacos obtenidos cuando son administrados solos. La fracción de inhibición de crecimiento se calculó siempre con respecto al control de cada ensayo (células sin tratamiento). Para determinar la inhibición de la viabilidad celular se utilizó la técnica de tinción con cristal violeta, del mismo modo que se describe en el apartado anterior.

2.4 Ensayos de formación de colonias en agar blando

El ensayo de formación de colonias en agar blando o "soft agar" habitualmente es usado para evaluar si una célula es capaz de crecer y dividirse sin adherirse a ningún tipo de superficie. Esta característica es propia de células con capacidad de transformación, y es muy frecuente en las células tumorales. Cuando las células crecen sobre un lecho de agar, lo hacen de manera agrupada dando lugar a grupos compactos de células conocidos como colonias.

Este ensayo se llevó a cabo en placas de 6 pocillos y se inició con la realización de una base o parte inferior compuesta por una solución de agar a 0,6% (Bacto™ Agar, Becton, Dickinson and Company), DMEM 2X (preparado a partir de Gibco® DMEM en polvo con agua ultrapura Milli-Q® esterilizada) y DMEM rico en glucosa (4,5 g/L (Laboratorios PAA®) suplementado con 20% de SBF (Laboratorios PAA®), en una proporción 1:1:2. Para la preparación de esta base, la solución de agar debe ser previamente calentada a 42°C, y los medios atemperados a 37°C. Una vez calientes, los tres componentes se mezclaron mediante suave agitación y se mantuvieron en un baño a 42°C. A continuación, 1 mL de esta mezcla se colocó en el fondo de una placa de 6 pocillos sin que quedaran burbujas. Después, se dejó que los pocillos se enfriaran a temperatura ambiente.

Tras ello, se preparó la parte superior que está compuesta por una solución de células y la misma solución que se preparó para la base del pocillo (agar a 0,6%, DMEM 2X y DMEM rico en glucosa suplementado con 20% de SBF) en una proporción 2:3. A continuación, se colocaron 0,8 mL de esta solución por pocillo. Para obtener la solución celular, las células fueron previamente tripsinizadas, contadas y diluidas en su medio de cultivo para que quedaran dispuestas a una densidad de 10.000 células/pocillo. Para el estudio del efecto de un fármaco sobre la formación de colonias, el fármaco en cuestión fue adicionado en la parte superior del agar junto con la solución celular a una concentración adecuada, y se dejó actuar durante los 14 días que duró el ensayo.

Pasados 14 días de incubación a 37°C y 5% de CO₂, las colonias resultantes fueron teñidas con cloruro de iodonitrotetrazolio (INTZ). Para ello, se colocó 1 mL de

solución de INTZ (Sigma Aldrich®) a una concentración de 1,5 mg/mL, sobre cada pocillo, y las placas se dejaron dentro del incubador durante toda la noche. La reducción del INTZ por parte de las colonias origina el compuesto formazán y se tiñen de color púrpura (Figura 19). De esta forma las colonias formadas pueden ser fácilmente fotografiadas con un escáner de luz visible (Image Scanner III, GE Healthcare Europe GmbH) y analizadas con el software Image Quant TL (GE Healthcare Europe GmbH). Para el recuento de las colonias formadas, solamente aquellas con un área superior a 100 μm se tuvieron en cuenta.



Figura 19: Procedimiento del ensayo en agar blando para determinar la formación de colonias y su tinción con INTZ.

2.5 Ensayos de clonogenicidad

El ensayo de clonogenicidad es un ensayo *in vitro* que se utiliza para determinar la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales cuando son expuestas a un agente citotóxico o a un proceso de irradiación, que fue desarrollado por Puck y Markus [246]. Este método consiste en determinar la capacidad que tiene una célula individual de dividirse y forma una colonia tras un tratamiento. A través de los ensayos de clonogenicidad se puede evaluar la capacidad de las células que tienen de recuperarse y seguir proliferando tras el tratamiento, o por el contrario, de morir tras la exposición del agente suministrado, por lo que es una forma de medir la sensibilidad de las células tumorales a un fármaco antitumoral. Aunque estos ensayos tienen ciertas limitaciones, como por ejemplo, que no tienen en cuenta las interacciones célula-célula que se producen en los tejidos, es un ensayo ampliamente utilizado para evaluar cómo responden las células tumorales frente a agentes citotóxicos.

Para el ensayo de clonogenicidad las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, por triplicado y a una densidad de 1.000 células por pocillo. Después de la

Materiales y Métodos

siembra, las células se cultivaron durante 24 horas. Para el experimento se colocaron pocillos suficientes para las siguientes condiciones:

- células control (con disolvente)
- células tratadas con ES 936 (0,1 μ M)
- células tratadas con 17-AAG (0,5 μ M)
- células tratadas con ES 936 (0,1 μ M) + 17-AAG (0,5 μ M)

Transcurridas las 24 horas, las células tratadas sólo con ES 936 o junto con 17-AAG fueron previamente tratadas con ES 936 durante 30 minutos. Después de la exposición de las células al tratamiento con ES 936, todas las células se lavaron con PBS, y a cada condición se le añadió medio de cultivo nuevo con su tratamiento correspondiente: DMSO (control), ES 936, 17-AAG, o por último, ES 936 junto con 17-AAG, y todos ellos se dejaron actuar durante 4 horas. Pasado este tiempo, todos los fármacos fueron retirados de los pocillos, las células se lavaron de nuevo con PBS, y a continuación se les añadió medio de cultivo. Las células se dejaron crecer durante 14 días en incubación a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este periodo, todos los pocillos fueron lavados con PBS, y se midió la viabilidad celular en cada uno de ellos mediante tinción con cristal violeta. Las colonias formadas en cada condición fueron fotografiadas con un escáner de luz visible (Image Scanner III, GE Healthcare Europe GmbH) y analizadas con el software Image Quant TL (GE Healthcare Europe GmbH), y solamente aquellas colonias con un área superior a 100 μ m se tuvieron en cuenta para el contaje.

3. Estudios mediante citometría de flujo

Los estudios de citometría de flujo se efectuaron con la utilización de un citómetro de flujo (BD FACSCanto™, Becton, Dickinson and Company) y su software de adquisición y análisis de datos BD FACSDiva™ versión 6.1.3 (Becton, Dickinson and Company).

3.1 Análisis de las fases del ciclo celular

Una de las formas de abordar el estudio de las fases del ciclo celular es cuantificar el contenido de ADN de las células, ya que éste varía en función de la fase del ciclo en la que se encuentren las células. La técnica empleada está basada en el

marcaje del ADN con el agente fluorescente yoduro de propidio. Este compuesto se intercala en los ácidos nucleicos de las células, produciendo que las células emitan mayor o menor fluorescencia, en función de su contenido de ADN (Figura 20).

Según esto, las células que se encuentran en la fase G_2/M del ciclo celular y, por lo tanto, han superado la fase de síntesis y han duplicado su material genético (dotación cromosómica tetraploide, $4n$), dan lugar a una señal de fluorescencia cuya intensidad duplica a la de las células que se encuentran en fase G_1 y tienen dotación cromosómica diploide ($2n$). La señal de las células que se encuentran en fase S (síntesis) se encuentra comprendida entre las que emiten las células en las fases G_1 y G_2/M . Por otra parte, las células apoptóticas o necróticas presentan fragmentación del ADN, y emiten menor fluorescencia que las que tienen el ADN íntegro (fase $SubG_1$).

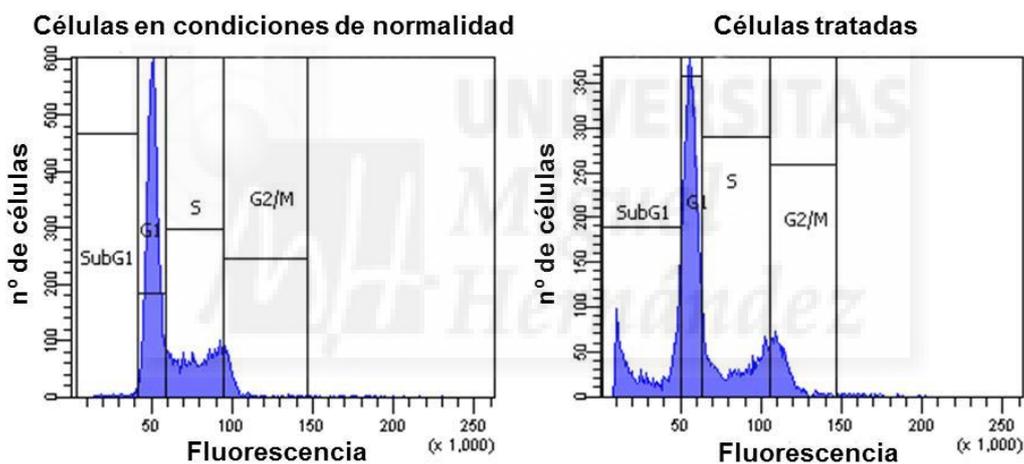


Figura 20: Perfil de ciclo celular obtenido mediante marcaje de ADN con yoduro de propidio por citometría de flujo. El ensayo se realizó en células cultivadas en condiciones normales (izquierda), y en células sometidas a un tratamiento determinado (derecha), donde se observa un aumento en el número de células en las fases G_2/M y $SubG_1$.

Para la realización de esta técnica las líneas celulares fueron sembradas a una confluencia entre el 50-60% y cultivadas durante 24 horas en frascos de cultivo. Tras este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y renovado por medio que incluía el fármaco a estudiar, o en las células control su disolvente, a una concentración constante durante diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Durante el tratamiento, las células se dejaron crecer a $37^{\circ}C$ y 5% de CO_2 . Tras el periodo de tiempo estipulado, las células fueron recogidas mediante tripsinización y se lavaron con PBS atemperado. A continuación, se añadió etanol frío al 75% (Panreac Química) sobre las células de forma

lenta y con agitación, y se fijaron durante al menos 30 minutos a -20°C . Tras la fijación, las células se precipitaron y se volvieron a lavar con PBS, tras lo que se disolvieron en una solución compuesta por PBS, 0,5% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma Aldrich®) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ribonucleasa A (ARNasa, SERVA Electrophoresis GmbH). Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en esta solución, con la que se consigue permeabilizar la membrana plasmática y la degradación del ARN. Por último, se procedió al marcaje fluorescente del ADN añadiendo yoduro de propidio (Sigma Aldrich®) en PBS a una concentración final de 0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y las células se incubaron en esta solución durante 15 minutos en oscuridad, para evitar la pérdida de fluorescencia de la solución. Transcurrido este tiempo, las células se analizaron en el citómetro de flujo a través de la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio, que se detectó con el láser que excita a 488 nm (láser azul).

3.2 Análisis de la fosforilación de la histona H3

La histonas son proteínas que forman parte importante de los nucleosomas, que a su vez son la unidad básica de la cromatina [247]. Una de estas histonas, en concreto la histona H3, es fosforilada en los residuos Ser10, Thr11 y Ser28 durante la mitosis, y su estado de fosforilación puede ser utilizado para detectar células que se encuentran en la fase de mitosis (fase M).

Para ello, las líneas celulares se prepararon del mismo modo que para el estudio del ciclo celular, descrito en el apartado anterior. En este ensayo, tras la fijación con etanol frío al 75%, las células fueron lavadas con una solución de PBS y 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich®), y a continuación se mezclaron en una solución compuesta por PBS y 0,5% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma Aldrich®) durante cinco minutos en frío. De nuevo, las células fueron lavadas con PBS-0,5% BSA y diluidas en esta misma solución a una densidad de $1 \cdot 10^6$ de células/mL. A continuación, se prepararon células para ser incubadas con un isotipo control Alexa Fluor®647 (BioLegend Inc.) (control negativo) o con un anticuerpo específico frente a histona H3 fosforilada en el residuo Ser28 y marcado con Alexa Fluor®647 (BioLegend Inc.) (células control y tratadas), todas ellas a una concentración $5 \text{ uL}/1 \cdot 10^6$ de células, durante dos horas, en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas

con PBS-0,5% BSA y se diluyeron en una solución con 25 µg/mL de ribonucleasa A (ARNasa, SERVA Electrophoresis GmbH) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizó el marcaje fluorescente del ADN añadiendo yoduro de propidio (Sigma Aldrich®) en PBS a una concentración final de 0,025 µg/mL, y las células se incubaron de nuevo 15 minutos en oscuridad. Tras ello, las células fueron analizadas en el citómetro de flujo, y la fluorescencia emitida por Alexa Fluor®647 se detectó utilizando el láser que excita a 633 nm (láser rojo), y la emitida por el yoduro de propidio se detectó utilizando el láser que excita a 488 nm (láser azul).

3.3 Sincronización celular

Para un estudio detallado de cómo afecta un fármaco a la división celular se puede realizar un ensayo donde las células comienzan desde un mismo punto del ciclo celular y avancen a partir de él. En condiciones de crecimiento normal, cada célula presenta una velocidad de crecimiento, pero si se utiliza un compuesto capaz de detener reversiblemente a las células en una fase en concreto del ciclo celular, cuando se retira este compuesto, todas las células inician el ciclo celular a partir de la misma fase. Afidicolina es un fármaco que inhibe la actividad de la ADN polimerasa α [248], evitando así que las células comiencen la síntesis de ADN y produciendo que se acumulen entre la fase tardía de G_1 e inicio de la fase S del ciclo celular [249]. Este efecto es reversible y no afecta a la viabilidad celular, y puede ser utilizado para sincronizar células en cultivo.

Para realizar este ensayo, las células fueron sembradas en frascos de cultivo con una confluencia entre el 50-60% y se dejaron crecer durante 24 horas en condiciones normales. La sincronización del cultivo celular comenzó pasadas las 24 horas con la adición de afidicolina a una concentración final de 1 µg/mL, que se dejó actuar bajo las mismas condiciones de cultivo durante otras 24 horas más. Transcurrido este tiempo, la afidicolina fue retirada y las células fueron lavadas con PBS, para eliminar cualquier resto de fármaco. A continuación, las células fueron tratadas con fármaco (NVP-AUY922) o su disolvente (DMSO) durante diferentes tiempos (4, 8, 16, 24 y 39 horas). Transcurrido el tiempo de tratamiento estipulado, las células fueron recogidas para el estudio de las fases del ciclo celular de igual modo que se explica en el apartado 3.1.

Además, también se recogieron células tras la retirada de afidicolina para comprobar que efectivamente se produjo una detención de las células en la fase G₁/S (tiempo 0).

3.4 Análisis de la muerte celular con Anexina V

Durante la muerte celular se producen cambios en la membrana de las células que pueden ser estudiados. Uno de estos cambios consiste en la translocación de una proteína de membrana, el fosfolípido fosfatidilserina (FS). En condiciones normales, el fosfolípido FS se localiza en la membrana plasmática hacia el espacio intracelular, pero durante la apoptosis se transloca desde el espacio intracelular de la célula hacia el espacio extracelular, por lo que queda expuesto en la superficie externa de la célula [250]. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos calcio-dependiente con una alta afinidad por FS, por lo que es capaz de unirse a las células que exponen FS al espacio extracelular. Además, esta proteína puede conjugarse con fluorocromos y es utilizada como un marcador específico de apoptosis [251].

Con este procedimiento se puede discriminar entre células viables, cuya integridad de la membrana está intacta, y células que están sufriendo un proceso apoptótico. En este último caso, las células presentan FS en la parte exterior de su membrana. Además, con la utilización de un colorante vital, como el 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) junto con Anexina V, se puede distinguir entre células en apoptosis temprana y necróticas. El colorante 7-AAD es capaz de penetrar en las células que han perdido la integridad de su membrana, llegar al núcleo y unirse al ADN, mientras que las células que mantienen su membrana intacta excluyen su entrada. El proceso de pérdida de integridad de la membrana y permeabilización de la misma es propio de las etapas tardías de la apoptosis y la necrosis celular. Por tanto, el uso de Anexina V marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), y 7-AAD, puede diferenciar varios tipos de poblaciones celulares, dependiendo de cómo sea su marcaje (Figura 21).

Las células viables no presentan translocación de FS ni rotura de la membrana plasmática por lo que no se tiñen con ninguno de los dos colorantes (FITC- / 7-AAD-). Las células en fases tempranas de la apoptosis presentan translocación de FS, pero aún mantienen intacta su membrana, por lo que presentan FS hacia el exterior que se une a Anexina V, pero no dejan pasar a 7-AAD (FITC+ / 7-AAD-). Las células en fases tardías de

la apoptosis pueden tener alterada la integridad de su membrana y se pueden teñir con ambos (FITC+ / 7-AAD+). Por último, las células que directamente tienen su membrana dañada se tiñen con 7-AAD (FITC- / 7-AAD+). El único inconveniente de este ensayo es que las células necróticas al tener rota la membrana celular también pueden ser teñidas con Anexina V, ya que se podría unir a la FS que se encuentra en el interior de la célula.

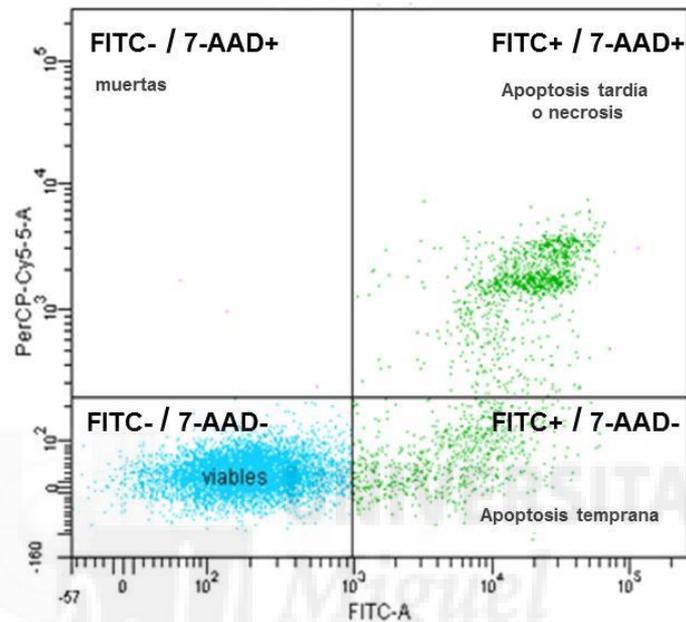


Figura 21: Gráfico que muestra la distribución de las células según su marcaje con FITC-Anexina V y 7-AAD. La fluorescencia que emite FITC-Anexina V es enfrentada a la emitida por 7-AAD y son creados cuatro cuadrantes para cuantificar el porcentaje de células que se localiza en cada uno de ellos.

Para la realización de la técnica las células fueron sembradas previamente en frascos de cultivo en condiciones de crecimiento normal con una confluencia entre el 50-70%, y tras 24 horas de crecimiento, el medio de cultivo fue retirado y reemplazado por medio nuevo que contenía el tratamiento (17-AAG o NVP-AUY922) o su disolvente (DMSO). Pasado el tiempo de tratamiento, las células fueron tripsinizadas con una solución atemperada de PBS y EDTA 2 mM (Sigma Aldrich®) con sumo cuidado, para que este proceso no afectara a la estructura de la membrana. A continuación, las células se contaron con la utilización de una cámara Neubauer y lavadas con PBS. Una vez lavadas, fueron diluidas en la solución "Binding Buffer", preparada con 0,1 M de HEPES (pH 7,4) (Laboratorios PAA®), 1,4 M de NaCl (Sigma Aldrich®) y 25 mM de Ca₂Cl (Sigma Aldrich®), quedando a una concentración final de 1*10⁶ células/mL. Un volumen de 0,1 mL (1*10⁵ células) de esta solución se introdujo en nuevos tubos, a los que no les

añadió nada (control negativo) o se les añadieron 5 μ L de FITC-Anexina V (Biolegend Inc.) y 5 μ L de 7-AAD (BD Pharmingen™, Becton, Dickinson and Company) (células control y tratadas). La mezcla se agitó suavemente y se incubó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 0,4 ml de la solución “Binding Buffer” en cada tubo, y las células fueron adquiridas y analizadas en el citómetro de flujo. La fluorescencia emitida por FITC-Anexina V y la emitida por 7-AAD se detectaron con la utilización del láser azul.

4. Estudios mediante microscopía

Para la realización de los estudios mediante microscopía y la toma de imágenes se utilizaron dos microscopios, un microscopio invertido modelo Nikon Eclipse Ti-S con una cámara Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc (Nikon Instruments Inc.) y un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss AG). Ambos disponían de programas especializados para la captura de imágenes: el software NIS-Elements BR 3.2 (64 bit), y el software ZEN lite, respectivamente.

4.1 Ensayos de inmunofluorescencia

Para estudiar visualmente cambios celulares a través de la microscopía de fluorescencia se llevaron a cabo técnicas de inmunotinción, que se describen a continuación. Para ello, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro, previamente esterilizados por calor seco, en placas de cultivo de 10 cm de diámetro en condiciones de crecimiento normal. Una vez que las células se adhirieron a los cubreobjetos y alcanzaron una confluencia del 60-70% (aproximadamente a las 24 horas), los cubreobjetos se trasladaron, uno a uno con unas pinzas estériles, a los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos. En los pocillos, las células fueron tratadas durante 24 horas con el fármaco a estudiar (17-AAG o NVP-AUY922) o su disolvente (DMSO). Trascurridas las 24 horas de tratamiento, el medio fue retirado de los pocillos y las células fueron lavadas con PBS. A continuación, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% (AppliChem GmbH) en PBS durante 10 minutos y lavadas nuevamente con PBS. Una vez fijadas, las células fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 (Sigma Aldrich®) al 0,3% (v/v) en PBS durante 15 minutos, y seguidamente se realizó una incubación con una solución de bloqueo, compuesta por

PBS junto con 0,3% de BSA, 10% de SBF, 5% de leche en polvo desnatada y 0,1% de Tritón X-100, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo, las células fueron incubadas con un anticuerpo primario (fosfo-histona H3 (Ser10) y α -tubulina, Tabla 11), para lo que se preparó previamente una placa Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro mojado en el fondo, para conseguir una atmósfera húmeda. Sobre el papel de filtro mojado, se colocó un trozo de parafilm transparente del mismo tamaño y bien liso, en el que se colocaron unas gotas del anticuerpo diluido en la solución de bloqueo. A continuación, los cubres con las células se dispusieron encima de las gotas de forma que las células estaban en contacto con el anticuerpo, y se dejaron incubar durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, todos los cubres fueron lavados, al menos tres veces, uno a uno introduciéndolos en una solución de PBS y 0,1% (v/v) de Tritón X-100, y de nuevo fueron colocados en otra placa Petri preparada de la misma forma que la anterior, pero con gotas que contenían los fluorocromos que pueden unirse a los anticuerpos primarios (Alexa Fluor[®]488, Alexa Fluor[®]568) y un marcador de la cromatina (Hoechst 33342) (Tabla 11). Tras su colocación, las células se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, los cubres fueron lavados tres veces con una solución de PBS y 0,1% Tritón X-100, y un último lavado con agua destilada.

Anticuerpo/Fluorocromo	Dilución	[]	Laboratorio
fosfo-histona H3 (Ser 10) (conejo)	1:500	200 μ g/mL	Santa Cruz Biotech., Inc
α-tubulina (ratón)	1:500	200 μ g/mL	Santa Cruz Biotech., Inc
Alexa Fluor[®] 488 anti-ratón	1:400	2 mg/mL	Molecular Probes [®]
Alexa Fluor[®] 568 anti-conejo	1:400	2 mg/mL	Molecular Probes [®]
Hoechst 33342	1:1000	10 mg/mL	Molecular Probes [®]

Tabla 11: Nombre y diluciones de los anticuerpos y fluorocromos empleados para ensayos de inmunotinción.

Para finalizar el procedimiento los cubres fueron montados en portaobjetos con la utilización de medio de montaje (5 μ L) específico para preparaciones teñidas con fluorocromos (Fluorescence Mounting Medium, Dako Denmark A/S). Tras el montaje, los portaobjetos se dejaron secar durante unos 5–10 minutos, tras lo que fueron

guardados a 4°C y protegidos de la luz, hasta que fueron examinados mediante el microscopio confocal, utilizando un objetivo 60X.

4.2 Estudio del estado de la cromatina

La condensación y la fragmentación de la cromatina son procesos asociados a la apoptosis. Por tanto, la visualización del estado de la cromatina mediante microscopía de fluorescencia, representa un método de estudio de los procesos apoptóticos. Para la realización de este ensayo se empleó el fluorocromo Hoechst 33342 (Molecular Probes®), capaz de marcar la cromatina introduciéndose en las células sin necesidad de permeabilización. De esto modo, permite la distinción de núcleos con condensación y/o fragmentación de cromatina de aquellos donde la cromatina se encuentra íntegra.

Para llevar a cabo esta técnica, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una confluencia del 50%, y se cultivaron durante 24 horas. Tras este tiempo, las células fueron tratadas con el fármaco a estudiar (17-AAG o NVP-AUY922) o con su disolvente (DMSO) durante 24 horas. Al finalizar el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol frío durante al menos una hora a -20°C. Tras la fijación, se retiró el metanol y de nuevo las células fueron lavadas con PBS. A continuación, se realizó el marcaje de la cromatina incubando las células durante 15 minutos con el fluorocromo Hoechst 33342 diluido en PBS, a una concentración de 3 µg/mL, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se observaron y fotografiaron en el microscopio de fluorescencia invertido, utilizando un objetivo 20X.

5. Estudio de los niveles de expresión de proteínas

5.1 Extractos de proteínas

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro con una confluencia entre el 50-70%, y se dejaron crecer durante 24 horas en condiciones normales. Pasado este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y reemplazado por medio de cultivo nuevo y el tratamiento correspondiente para cada condición (fármaco o disolvente). Tras el tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas con tampón PBS, recogidas con la utilización de raspadores, y precipitadas por centrifugación a 4°C. Tras esto, se procedió a la lisis de las células para lo que se eliminó el sobrenadante y se

suspendieron los precipitados celulares en tampón de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM Tris-HCl a pH 7,4, todos los productos son de Sigma Aldrich®), a una proporción entre 50-100 μL dependiendo del tamaño del pellet obtenido. Además, a cada pellet se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich®) en una concentración de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para que se produjera la lisis. Finalizado este tiempo, el lisado se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y a velocidad máxima (16000 x g) en una microcentrífuga, para precipitar el material no solubilizado. Los sobrenadantes de la centrifugación constituyeron los extractos de proteínas y fueron guardados a -20°C hasta su utilización.

5.2 Ensayo Bradford

Para determinar la concentración de proteína de los extractos de proteínas obtenidos se utilizó un reactivo comercial (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc) basado en el método colorimétrico Bradford [252]. En resumen, este ensayo consiste en la determinación de la concentración de proteínas en solución cuando se encuentran unidas a un colorante, el azul brillante de Coomassie® G-250, mediante la determinación de la variabilidad de la absorbancia visible. El colorante presenta un color rojizo (forma catiónica), pero al contacto con las proteínas pierde protones y adquiere una coloración azul (forma aniónica), cuyo máximo de absorbancia cambia de 465 nm a 595 nm. Por tanto, al medir la absorbancia a 595 nm se puede cuantificar la concentración de proteína, que según la ley de Lambert-Beer es directamente proporcional a la medida de absorbancia.

Antes de determinar la concentración de proteína en los extractos obtenidos, se preparó una recta de calibrado (concentración de proteína *versus* absorbancia) con una proteína estándar (albúmina de suero bovino (BSA), Sigma Aldrich®) y diluida en un rango de concentraciones entre 0,2-1 mg/mL. A continuación, se pipetearon 10 μL de cada una de las diluciones de la proteína estándar y 10 μL de los extractos obtenidos en una placa de 96 pocillos por duplicado. A cada uno de los pocillos se le añadieron 200 μL de colorante diluido (1/5) y se agitó la placa. Pasados 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro de placas

(Infinite[®] M200 PRO NanoQuant, Grupo Tecan) a una longitud de onda de 595 nm. Por último, se interpoló la absorbancia de las muestras en la recta de calibrado para obtener su concentración proteica.

5.3 Análisis de proteínas mediante Western Blot

Para la separación de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato sódico (SDS) o SDS-PAGE (siglas de Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) en un sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Inc).

5.3.1 Preparación de las muestras para electroforesis

De cada muestra de extracto proteico, en función de la concentración determinada en el ensayo Bradford, se tomó el volumen correspondiente a 80 µg de proteína y se le añadió una quinta parte de tampón de carga compuesto por: 312,5 mM Tris pH 6,8, 10% SDS, 50% glicerol, 0,5% (p/v) azul de bromofenol y 5% β-mercaptoetanol (todos los productos son de Sigma Aldrich[®]), y se igualó el volumen de las muestras con tampón de lisis. El detergente SDS es un agente tensioactivo aniónico gracias al cual las proteínas son desnaturizadas, es decir, pierden su estructura tridimensional. El β-mercaptoetanol también contribuye a la desnaturización de las proteínas por ser un compuesto reductor capaz de romper los puentes disulfuro que pueda contener una proteína en su estructura terciaria y cuaternaria. Una vez preparadas, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 95°C para la completa desnaturización de las proteínas.

5.3.2 Electroforesis

Para la separación de las proteínas por tamaño se utilizó la técnica SDS-PAGE. Esta técnica usa el detergente SDS, porque como se ha explicado, es capaz de causar la desnaturización de una proteína, pero también porque confiere a las proteínas una carga negativa proporcional a la longitud de la cadena polipéptidica, lo que hace que la relación carga/masa de una proteína sea bastante uniforme y que la distancia de migración en un gel se produzca únicamente en función de su tamaño. Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron geles de poliacrilamida de 10 calles y 1,5 mm de grosor compuestos por dos fases: una porción superior concentradora, de baja concentración

de poliacrilamida (4,5%), y una porción inferior separadora (Tabla 12). En la primera fase se produce la concentración de proteínas en un mismo punto para que entren al mismo tiempo en el gel, y en la segunda fase se desarrolla la separación de las proteínas por tamaño. El porcentaje de acrilamida de esta última fase varía en función del peso molecular de la proteína a analizar.

Composición	P. concentradora	P. separadora	Laboratorio
Acrilamida/ bisacrilamida 30%	4,5%	variable	ProtoGel [®] , National Diagnostics
H ₂ O	60,2%	variable	Milli-Q [®] , Millipore Corp.
Tris-HCl pH 8,8	-----	255 mM	Sigma Aldrich [®]
Tris-HCl pH 6,8	123 mM	-----	Sigma Aldrich [®]
SDS 10%	1%	1%	Sigma Aldrich [®]
PSA	0,07%	0,07%	Sigma Aldrich [®]
TEMED	0,07%	0,07%	Sigma Aldrich [®]

Tabla 12: Componentes de los geles de electroforesis y concentraciones de los mismos. Los agentes polimerizantes del gel empleados fueron persulfato amónico (PSA) y N,N,N,N-tetrametilileno diamina (TEMED).

Para identificar la proteína de interés según su peso molecular, se cargaron en el gel como referencia 5-10 µl de marcadores estándares de peso molecular teñidos con azul de bromofenol (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad Laboratories, Inc), que abarcan un rango de pesos moleculares entre 10 y 250 kDa.

La electroforesis se desarrolló colocando las muestras en los geles dentro de la cubeta del sistema de electroforesis y sumergidos en el tampón de electroforesis compuesto por: 20 mM de Tris, 200 mM de glicina y SDS 0,1% (p/v) a un pH 8,3, y aplicando un voltaje constante, de bajo voltaje (80 V) para el gel concentrador y de alto voltaje (150 V) para el separador.

5.3.3 Transferencia a membrana

Después de finalizar la electroforesis, las proteínas ya separadas por su peso molecular fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc) o de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon[®]-P, Millipore Corp.) por ser un medio más estable y rígido que el gel, y por presentar una alta capacidad de retención

de proteínas. Previamente, las membranas de PVDF fueron humedecidas con metanol y lavadas con agua destilada durante 5 minutos y a continuación sumergidas en el tampón de transferencia, al menos durante 10 minutos. Una vez preparadas las membranas, se llevó a cabo el montaje de lo que se conoce como “sándwich”, en el que el gel de la electroforesis entra en contacto directo con la membrana de nitrocelulosa o PVDF, y a cada lado se le colocan varios papeles absorbentes Whatman® (GE Healthcare Europe GmbH) y una almohadilla (Figura 22).

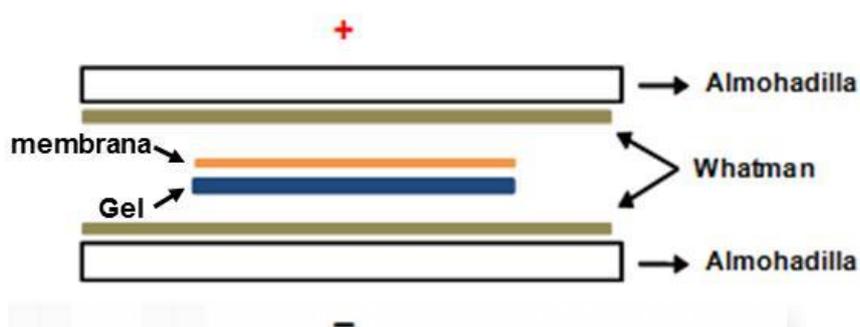


Figura 22: Sándwich de transferencia. Para formar un sándwich se coloca el gel, la membrana de nitrocelulosa o PVDF, papeles absorbentes y almohadillas, tal y como representa en la figura. Al aplicar un campo eléctrico perpendicular al gel, las proteínas migran desde el gel (cerca del polo negativo) hacia la membrana (cerca del polo positivo) y quedan inmovilizadas en la membrana.

Todo el sándwich se coloca de nuevo en la cubeta del sistema de electroforesis, sumergido en un tampón de transferencia compuesto por: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 20% de metanol. El proceso de transferencia se realizó a 4°C durante dos horas a un voltaje constante de 100 V, para los geles con un porcentaje de acrilamida inferior al 10%, o 110 V, para los geles con un porcentaje de acrilamida igual o superior al 10%.

5.3.4 Bloqueo de la membrana

Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa o PVDF fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora compuesta por tampón TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,6), 0,05% de Tween®20 (Sigma Aldrich®), y un 5% de leche en polvo desnatada o BSA. Las proteínas de la solución bloqueadora se unen inespecíficamente a todas las porciones de membrana que no han interactuado con proteínas (procedentes del gel tras la transferencia) y así

se puede prevenir en gran parte la posible unión inespecífica de los anticuerpos que se utilizan posteriormente.

5.3.5 Incubación con anticuerpos primarios

El siguiente paso consistió en la incubación de las membranas ya bloqueadas con los diferentes anticuerpos primarios en agitación continua a 4°C durante toda la noche, para permitir que los anticuerpos se unan a las proteínas de interés. Los anticuerpos empleados fueron preparados en una solución TBS-T (tampón TBS con 0,05% de Tween®20) con leche en polvo desnatada (2%) o BSA (1%), y fueron utilizados según las recomendaciones de sus hojas técnicas (Tabla 13).

Anticuerpo	Naturaleza	Dilución	Peso m.	Referencia/ Marca
HSP 90 α/β	monoclonal	1:2000	90 kDa	sc-13119/Santa Cruz Biotechnology®
HSP 70	monoclonal	1:2000	70 kDa	sc-373867/Santa Cruz Biotechnology®
EGFR	policlonal	1:1000	170 kDa	sc-03/Santa Cruz Biotechnology®
HER2	policlonal	1:250	185 kDa	sc-284/Santa Cruz Biotechnology®
HER3	policlonal	1:250	180 kDa	sc-285/Santa Cruz Biotechnology®
HER4	policlonal	1:1000	180 kDa	sc-283/Santa Cruz Biotechnology®
Akt (pan)	monoclonal	1:100	60 kDa	4691/ Cell Signaling Technology®
Erk 1/2	policlonal	1:500	42, 44 kDa	9102/ Cell Signaling Technology®
fosfo-Erk 1/2	policlonal	1:500	42, 44 kDa	9101/ Cell Signaling Technology®
RPS6	policlonal	1:500	32 kDa	2217/ Cell Signaling Technology®
fosfo-RPS6	policlonal	1:1000	32 kDa	2211/ Cell Signaling Technology®
Ciclina B1	policlonal	1:500	60 kDa	sc-594/Santa Cruz Biotechnology®
Cdc2	policlonal	1:500	34 kDa	sc-53/Santa Cruz Biotechnology®
fosfo-Cdc2 (tyr15)	policlonal	1:1000	34 kDa	PA1-4617/ Pierce Biotechnology®
Mdr-1	monoclonal	1:250	170 kDa	sc-13131/Santa Cruz Biotechnology®
MRP1	policlonal	1:500	190 kDa	sc-13960/Santa Cruz Biotechnology®
BCRP1	policlonal	1:500	72 kDa	sc-25822/Santa Cruz Biotechnology®
NQO1	monoclonal	1:500	31 kDa	sc-271116/Santa Cruz Biotechnology®
β -actina	policlonal	1:1000	42 kDa	A 2066/ Sigma Aldrich®

Tabla 13: Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.

5.3.6 Incubación con anticuerpos secundarios

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron sometidas a tres lavados de 10 minutos con suave agitación en una solución de TBS-T

Materiales y Métodos

para eliminar los posibles restos de anticuerpo primario. Posteriormente, se incubaron durante una hora, en agitación orbital y a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario que está conjugando con la enzima de peroxidasa de rábano (HRP). Durante este tiempo, el anticuerpo secundario es capaz de unirse al anticuerpo primario previamente incubado. Los anticuerpos secundarios empleados (conejo- α HRP o ratón- α HRP, GE Healthcare Europe GmbH) fueron preparados en solución TBS-T con leche desnatada en polvo (1%) o BSA (1%), de acuerdo a la preparación del anticuerpo primario, en una dilución final 1:5.000. Por último, las membranas de nuevo fueron lavadas dos veces con TBS-T y una vez con TBS, durante 10 minutos cada uno de los lavados.

5.3.7 Inmunodetección

Para la inmunodetección de las proteínas se utilizó la señal de quimioluminiscencia o de quimiofluorescencia que es capaz de desencadenar la enzima HRP, que se encuentra conjugada a los anticuerpos secundarios unidos a la membrana. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del reactivo luminol, que en condiciones alcalinas y tras su oxidación produce una sustancia que emite una intensa luz, que puede ser detectada por sistemas de imagen. Para llevar a cabo esta reacción, las membranas fueron incubadas con sustratos reveladores que contienen luminol, y diferentes sistemas de captura de imágenes. Las membranas de nitrocelulosa fueron reveladas con el líquido revelador Pierce™ ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.) y la señal quimioluminiscente fue capturada en películas fotográficas (Hyperfilm ECL, GE Healthcare Europe GmbH). En las membranas de PVDF se utilizó este mismo líquido revelador, y se detectó la señal quimiofluorescente que también emite en un sistema de escaneado láser (Typhoon 9410, GE Healthcare Europe GmbH). Por otro lado, en algunos casos donde se requería una detección más sensible, las membranas de PVDF fueron incubadas con SuperSignal™ West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.) y la señal quimioluminiscente emitida fue capturada en una cámara-CCD (ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad Laboratories, Inc).

5.3.8 Reutilización de la membrana

En ocasiones, una misma membrana fue utilizada para detectar diferentes proteínas, de igual o distinto peso molecular, de los mismos extractos proteicos. Para ello, las membranas fueron tratadas para eliminar los anticuerpos con los que previamente habían sido incubadas con una solución reductora, y después fueron lavadas, bloqueadas e incubadas con los nuevos anticuerpos frente a las proteínas de interés (este proceso en inglés se conoce como "stripping").

El proceso consistió en el lavado de las membranas dos veces con solución TBS-T durante 5 minutos e incubadas con el tampón reductor compuesto por 100 mM de β -mercaptoetanol, 2% de SDS y 62,5 mM de Tris a pH 6,8 durante 30 minutos a 50°C en una estufa de secado para eliminar los anticuerpos que se encontraban unidos a la membrana. Las membranas de PVDF fueron previamente incubadas con acetonitrilo (Panreac Química) durante 10 minutos en agitación suave para una mejor eliminación de los anticuerpos. Por último, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con TBS-T. Con este proceso se rompe la unión de los anticuerpos con sus antígenos, y las membranas quedan preparadas para ser utilizadas nuevamente.

6. Estudio del estado de fosforilación de proteínas

Para analizar el estado de fosforilación de proteínas de interés para nuestro estudio (Tabla 14), se empleó un sistema de detección comercial llamado Human Phospho-MAPK Array Kit (ARY002B, Proteome Profiler™, R & D Systems), que puede detectar los niveles relativos de fosforilación de varias quinasas diferentes, entre las que encontramos proteínas intracelulares implicadas en el desarrollo y la proliferación celular.

El sistema se basa en un inmunoensayo que está compuesto por una membrana de nitrocelulosa que contiene inmovilizados los anticuerpos (por duplicado), y sobre ellos se incuban los extractos de proteínas procedentes de las células (antígenos) con una mezcla de anticuerpos específicos conjugados con biotina. De esta forma el antígeno queda capturado entre dos anticuerpos, formando un "sándwich" (Figura 23). La detección de la señal de cada punto de captura se realiza aportando estreptavidina,

que tiene una alta afinidad por la biotina, y que además está conjugada a la enzima HRP, para que utilizando reactivos reveladores se pueda detectar la señal que emite.

Proteína Diana	Nomenclatura alternativa	Fosforilación del sitio de detección
Akt 1	PKB α , RAC α	Ser473
Akt 2	PKB β , RAC β	Ser474
Akt 3	PKB γ , RAC γ	Ser472
Akt pan	-----	Ser473, Ser474, Ser472
p70 S6 quinasa	S6K1, p70 α , RPS6KB1	Thr421/Ser424
Erk 1	MAPK3, p44 MAPK	Thr202/Tyr204
Erk 2	MAPK1, p42 MAPK	Thr185/Tyr187
RSK1	MAPKAPK1 α , RPS6KA1	Ser380

Tabla 14: Nombre y sitio de fosforilación de las proteínas estudiadas y detectadas en la membrana del kit Human Phospho-MAPK Array. Leyenda: Ser (serina), Thr (treonina), Tyr (tirosina).

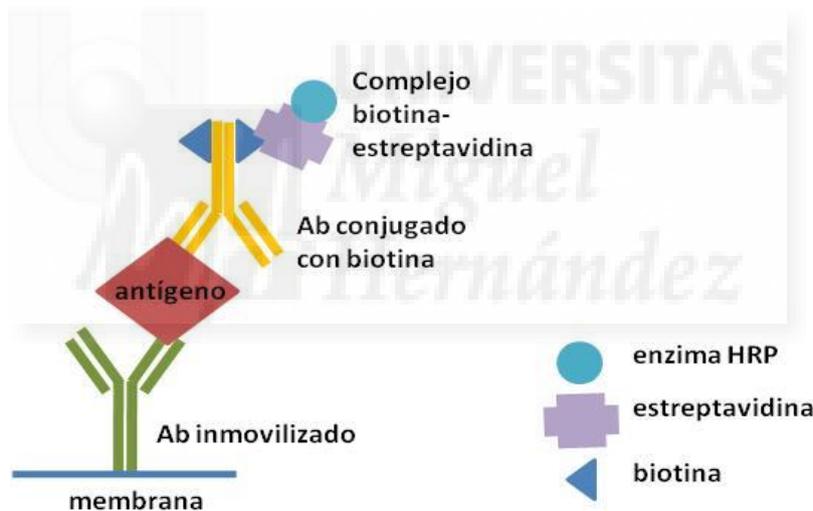


Figura 23: Esquema ilustrativo del kit Human Phospho-MAPK Array. Una proteína específica forma un "sándwich" que permite detectar su presencia en un extracto celular.

Previamente a la utilización del kit, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro con una confluencia entre el 50-70%, y se dejaron crecer durante 24 horas en condiciones normales. Pasado este tiempo las células fueron tratadas con fármaco (17-AAG o NVP-AUY922) o su disolvente (DMSO) durante 24 horas, tras lo cual se procedió a la extracción de proteínas y la determinación de la concentración de proteína usando el método de Bradford, como se ha explicado en el apartado 5.2.

Una vez obtenidos los extractos celulares, se desarrolló el ensayo siguiendo las instrucciones descritas por la casa comercial que a continuación pasamos a describir de forma resumida. Para comenzar, las membranas del kit fueron bloqueadas con un tampón de bloqueo (Array buffer 5) durante 1 hora en agitación. Durante este tiempo, 300 µg de proteína de cada muestra fueron ajustados a un volumen final de 1,5 mL con tampón diluyente (Array buffer 1) e incubados con 20 µL de una mezcla de anticuerpos biotinados (Detection Antibody Cocktail) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, cada muestra preparada fue añadida a una membrana e incubada durante toda la noche a 4°C en agitación. Pasado este tiempo, las membranas fueron lavadas tres veces con un tampón de lavado (Wash buffer) durante 10 min e incubadas durante 30 min con estreptavidina-HRP. Por último, las membranas se volvieron a lavar de igual modo. Para la detección de las proteínas, se usó el líquido revelador Pierce™ ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.) y la señal quimiofluorescente que emite fue detectada en un sistema de escaneo láser (Typhoon 9410, GE Healthcare Europe GmbH).

7. Estudio de la actividad enzimática

Para el estudio de la actividad enzimática se realizaron ensayos mediante espectrofotometría, en los que se cuantificó la actividad de la enzima NQO1 en extractos celulares midiendo la velocidad de reducción del reactivo 2,6-dicloroindofenol (DCPIP). El DCPIP es un compuesto químico que en su forma oxidada tiene una coloración azul cuya máxima absorción es de 600 nm, mientras que en su forma reducida es incoloro, por lo que es habitualmente usado como colorante en reacciones redox. La enzima NQO1 es una flavoproteína capaz de transferir dos electrones en presencia de piridín-nucleótidos reducidos (NADH o NADPH) y flavín-nucleótidos (FAD) a un aceptor de electrones. En este ensayo, el compuesto DCPIP es el aceptor de electrones de la reacción, cuyo coeficiente de extinción es igual a $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Figura 24).

Teniendo en cuenta la concentración del producto desaparecido con respecto al tiempo, se cuantificó la actividad enzimática de NQO1. Esta metodología se realizó en base al procedimiento desarrollado por Ernster [190], y modificado posteriormente por Benson [253]. Para descartar cualquier actividad producida por otras quinonas

Materiales y Métodos

reductasas que se encuentren en el extracto celular, todos los ensayos se realizaron por duplicado y en paralelo, uno en presencia de dicumarol (3,3'-metilen-bis (4-hidroxi-2-coumarin)) y otro en ausencia de dicumarol. El dicumarol es un inhibidor selectivo de NQO1 [254]. Por tanto, la actividad específica de NQO1 de los extractos celulares fue calculada usando la diferencia entre velocidad de reducción de DCPIP en presencia/ausencia de dicumarol.

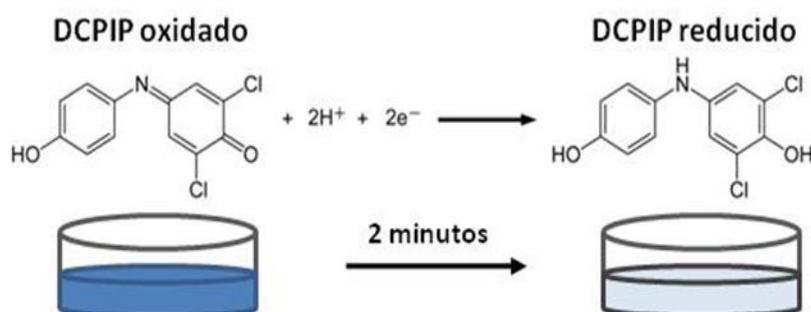


Figura 24: Reducción del compuesto DCPIP. Se midió la desaparición del color azul de la forma oxidada de DCPIP por acción de la enzima NQO1 durante 2 minutos.

Además, también se determinó de la actividad de NQO1 en los extractos celulares después del tratamiento de las células en cultivo con un fármaco inhibidor específico de NQO1 llamado ES 936 (5-metoxi-1,2-dimetil-3-[(nitrofenoxi) metil]-1H-indol-4,7-diona), para determinar si efectivamente este compuesto era capaz de producir la inhibición de la actividad de NQO1 en las células. Este compuesto utiliza un mecanismo de inactivación "suicida", que consiste en unirse de forma irreversible a una enzima inhibiendo por completo su acción. ES 936 se une al sitio activo de NQO1 y forma un complejo irreversible inhibidor-enzima a través de una unión covalente [255]. ES 936 es capaz de inhibir el 95% de la actividad de NQO1 de varias líneas celulares tumorales a una concentración de 0,1 μ M y en un tiempo de exposición de 30 min [256].

Para realizar este ensayo las células se cultivaron durante 72 horas, para que alcanzaran una confluencia de entre el 80-90%, en placas de cultivo de 10 cm. Para cada línea celular se colocó una placa control y una tratada previamente con ES 936 0,1 μ M durante 30 min. Al finalizar el tratamiento con ES 936, las células de ambas condiciones fueron lavadas dos veces empleando PBS, y raspadas con una solución que contenía 25 mM de Tris-HCl pH 7,4, 250 mM de sucrosa y 5 μ M de FAD en hielo (todo los productos

de Sigma Aldrich®). A continuación, a cada solución celular se le añadieron 10 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich®), y fueron sonicadas durante tres periodos de 5 segundos en hielo. Tras el proceso de sonicación, las soluciones celulares fueron centrifugadas a velocidad máxima (16000 x g) durante 30 min en una microcentrífuga, y los sobrenadantes fueron recogidos. La concentración proteica de los extractos sonicados fue determinada mediante el ensayo Bradford, como ya ha sido descrito, y se decidió tomar 10 µg de proteína de cada condición para medir la actividad de NQO1. Para ello, los 10 µg de proteína fueron diluidos en una solución que contenía 25 mM de Tris-HCl a pH 7,4, 0,7 mg/ml de BSA y 200 µM de NADH (Sigma Aldrich®) hasta un total de 1 mL. En este punto, se prepararon dos tipos de muestras, una en presencia de 20 µM de dicumarol y otra en ausencia de este compuesto (Tabla 15). Por último, se realizó la medición de la actividad de NQO1 en placas de 24 pocillos en un espectrofotómetro de placas (Infinite® M200 PRO NanoQuant, Grupo Tecan) a una longitud de onda de 600 nm y a temperatura ambiente (27°C). Antes de realizar la lectura de cada pocillo, se procedió a la adición de 40 µM de DCPIP y se midió la absorbancia durante 2 min. Utilizando la ley de Lambert-Beer se calculó la concentración de desaparición de DCPIP en intervalos de tiempo de aproximadamente de 6 segundos, y así se calculó la actividad específica de esta enzima.

Vol. pocillo control	Reactivo	Vol. pocillo con dicumarol
100 µL	Tris-HCl pH 7,4	100 µL
206 µL	BSA	206 µL
10 µL	NADH	10 µL
10 µL	DCPIP	10 µL
-----	Dicumarol	5 µL
674 µL - vol. lisado	H ₂ O	669 µL - vol. lisado
Variable (para 10 µg)	Lisado cel.	Variable (para 10 µg)

Tabla 15: Volumen de los reactivos empleados en el ensayo de actividad enzimática. Para todos los pocillos el volumen final fue de 1 mL. La altura de la columna de líquido en todos los pocillos fue de 0,5 cm.

8. Ensayos de silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia

El silenciamiento de genes a través pequeñas moléculas de ARN de doble cadena conocidas como ARN de interferencia (ARNi) es una herramienta ampliamente utilizada para regular de manera artificial genes de nuestro interés. Este proceso de silenciamiento genético se encuentra en multitud de organismos, incluidas las células eucariotas, aunque aún no se conoce en profundidad por qué los organismos mantienen este mecanismo, aunque se le atribuyen funciones como ser un mecanismo antiviral y participar en la expresión genética durante el desarrollo embrionario [257]. Estos ARNi, de 21-25 nucleótidos, proceden de ARN de doble cadena (dsRNA) que son procesados por varias enzimas de la familia RNAsa tipo III hasta que finalmente se unen a su ARN mensajero (ARNm) complementario y lo degradan. Esta degradación interrumpe la información que se transmite a través de los ARNm desde el ADN hasta la maquinaria de síntesis de proteínas. Al eliminar la síntesis de una proteína específica se puede estudiar como este fenómeno afecta a la célula.

Para realizar este ensayo se utilizó un ARNi sintetizado químicamente e introducido en las células a través de la transfección. La transfección es una técnica que se usa para introducir material genético al interior de una célula, y para llevarla a cabo uno de los mecanismos más utilizados es la lipofección. La lipofección se sirve de lípidos catiónicos sintéticos, que son capaces de formar espontáneamente vesículas con ácidos nucleicos en su interior, y de interaccionar con la membrana celular. En nuestro caso, se utilizó como lípido la lipofectamina y las condiciones del ensayo fueron optimizadas para obtener una buena eficiencia de transfección con una confluencia celular aceptable (entre 70-80%).

Para el estudio del silenciamiento de NQO1 las células fueron transfectadas con el ARNi contra el ARNm de NQO1 (ARNi NQO1) (Figura 25), o con una secuencia inespecífica (“scrambled”) que no degrada ningún ARNm celular conocido, y que sirvió de control de la transfección. Este ensayo de interferencia es *transitorio*, porque la expresión del gen es silenciada temporalmente.

5'-GUCUUAGAACCUCAACUGATT-3'

3'-TTCAGAAUCUUGGAGUUGACU-5'

Figura 25: Secuencia del ARNi de NQO1 (Silencer® Select Validado siRNA, Ambion®) utilizado en los ensayos de silenciamiento.

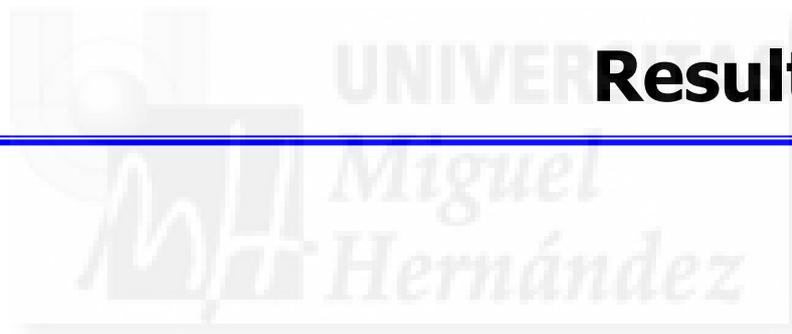
Las células fueron sembradas paralelamente en placas de 96 pocillos y de 6 pocillos a una confluencia entre el 30-50%. Esta siembra se realizó con medio de cultivo suplementado con 10% de SBF, previamente inactivado, y sin antibióticos, y las células se dejaron crecer durante 24 horas. Para la transfección, se utilizó una solución que contenía como vehículo de transfección lipofectamina (Lipofectamine™ RNAiMAX, Invitrogen™), que se usó a una concentración final de 2,5 µL/mL, y ARNi de NQO1 (Figura 25) o ARNi inespecífico ("scrambled") (siRNA-A, Santa Cruz Biotechnologies, Inc.), ambos a una concentración final de 6,25 pmoles/mL. Todos ellos fueron diluidos previamente en medio de cultivo Opti-MEM® Reduced Serum (Gibco®) e incubados durante 5 min a temperatura ambiente por separado. A continuación, la lipofectamina y el ARNi fueron mezclados e incubados durante 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla fue añadida gota a gota y con agitación al cultivo celular. La transfección se realizó durante 24 horas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ y finalizó retirando todo el medio de cada pocillo, tras lo cual las células fueron cultivadas con medio de cultivo DMEM rico en glucosa (4,5 g/L) (Laboratorios PAA®). A continuación, las células fueron tratadas con el fármaco (17-AAG) o con el disolvente adecuado (DMSO). Transcurridas 72 horas de tratamiento, se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad en las placas de 96 pocillos por sextuplicado mediante tinción con cristal violeta, y el análisis de niveles de proteínas mediante Western blot y los ensayos de actividad enzimática se realizaron con las células sembradas en las placas de 6 pocillos. Para todos los experimentos se dispusieron cuatro condiciones:

- células sin transfectar
- células con ARNi inespecífico o secuencia "scrambled" (ARN S)
- células con ARNi NQO1 + disolvente (DMSO)
- células con ARNi NQO1 + fármaco (17-AAG 0,5 µM)

9. Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron al menos tres ocasiones ($n \geq 3$) y los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas se estimaron a partir de p : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Las diferencias se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas. También se utilizó el test no paramétrico de Spearman para calcular la correlación entre la actividad de la enzima de NQO1 y la sensibilidad a los fármacos 17-AAG y NVP-AUY922, representada con la IC_{50} para cada fármaco de cada línea celular. Para la realización de los test se utilizaron los programas: GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) o el programa SPSS versión 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).





Resultados

1. Estudio de los niveles de expresión de HSP90

Para dar comienzo a este estudio sobre la inhibición de la chaperona HSP90 en líneas celulares de CP y de CCR, se caracterizaron los niveles basales de HSP90 en cada una de las líneas celulares incluidas en el estudio. Como ha sido descrito en la introducción, la chaperona HSP90 es una proteína constitutiva y se expresa en todas las células, y como era de esperar, y así se puede apreciar en la Figura 26, en todas las líneas celulares analizadas se obtuvieron niveles apreciables de expresión de HSP90.

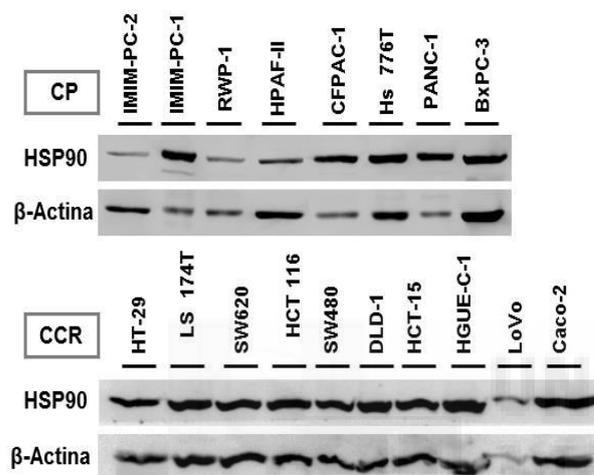


Figura 26: Expresión de HSP90 en las líneas celulares de CP y CCR. Las células se cultivaron durante 48 horas y los extractos fueron analizados mediante Western blot usando anticuerpos frente a HSP90 y β -actina. La imagen corresponde a un experimento representativo.

El densitometrado de las bandas revela que las líneas de CP presentan diferentes niveles de HSP90, siendo las líneas celulares **PANC-1**, **CFPAC-1** e **IMIM-PC-1** las que presentan mayores niveles de expresión de HSP90 (Figura 27).

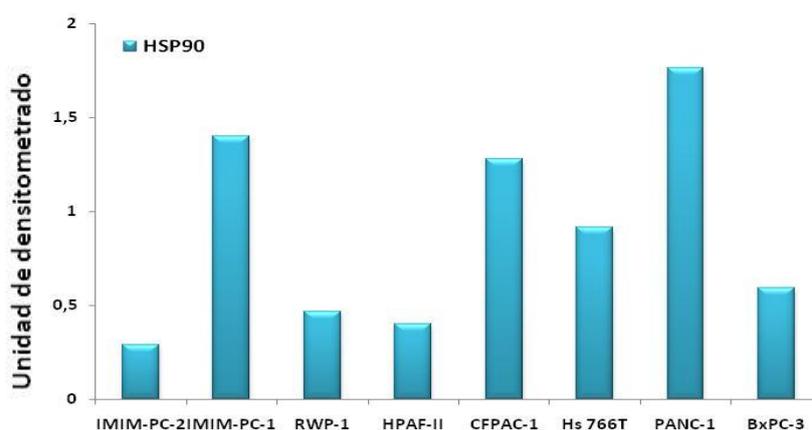


Figura 27: Densitometrado de la expresión de HSP90 en las líneas celulares de CP. Los valores de HSP90 para cada línea representados en la figura anterior fueron normalizados frente a β -actina.

Resultados

Por otro lado, las líneas de CCR presentan una expresión de HSP90 más homogénea, y entre las líneas con mayor expresión de HSP90 se encuentran las células LoVo, HCT-15, HCT 116 y DLD-1. (Figura 28).

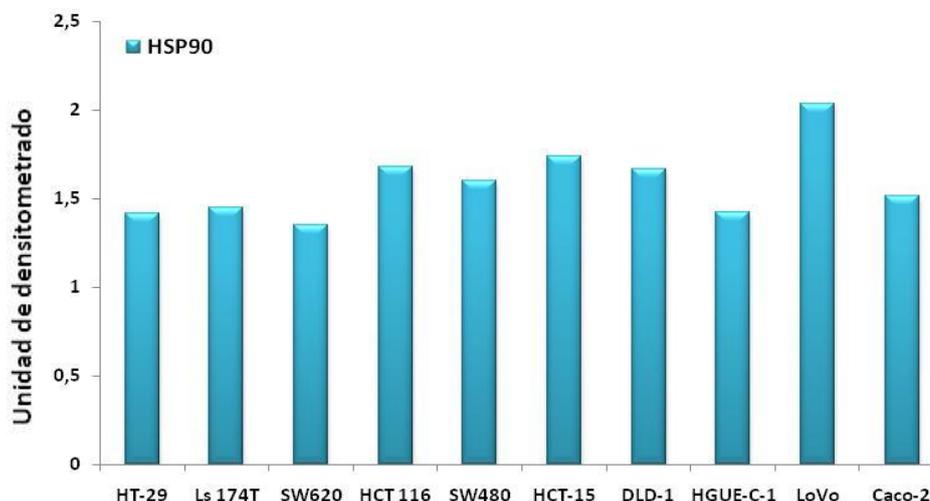


Figura 28: Densitometrado de la expresión de HSP90 en las líneas celulares de CCR. Los valores de HSP90 para cada línea representados en la figura anterior fueron normalizados frente a β -actina.

2. Efectos de la inhibición de HSP90 sobre la proliferación celular

2.1 Efectos sobre la proliferación celular dependiente de anclaje

Sabiendo que los niveles de expresión de HSP90 son moderados o altos en todas las líneas celulares seleccionadas, el siguiente paso fue determinar el efecto anti-proliferativo de los inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922 en todas las líneas celulares. Asimismo, también se realizaron experimentos con algunos cultivos primarios obtenidos a partir de muestras tumorales de pacientes con CCR. Todas las células fueron cultivadas como se explica en materiales y métodos, y los ensayos de proliferación celular se basaron en el metabolismo de MTT o tinción con cristal violeta.

2.1.1 Efecto antiproliferativo de 17-AAG

En el caso de las ocho líneas celulares de CP, los resultados experimentales indicaron que el tratamiento con 17-AAG durante 72 horas, con concentraciones comprendidas entre 0,001 y 2 μ M, disminuye la proliferación de las líneas celulares de manera concentración-dependiente, aunque esta reducción no es igual en todas las líneas celulares. Por un lado, se observa una reducción superior al 50% de la proliferación en casi todas las líneas celulares estudiadas a 2 μ M, la máxima

concentración utilizada en los ensayos (en orden de menor a mayor IC_{50} : **RWP-1**, **Hs 766T**, **IMIM-PC-1**, **HPAF-II**, **BxPC3** e **IMIM-PC-2**) (Tabla 16, Figura 29). Por otro lado, las líneas celulares **CFPAC-1** y **PANC-1** presentan una menor disminución en su proliferación, ya que en ambos casos, 17-AAG solamente fue capaz de inhibir aproximadamente entre el 35-40% del crecimiento a 2 μ M. Para estas líneas celulares se consideró que su IC_{50} es superior a esta concentración (Tabla 16).

Por tanto, se distinguen dos grupos de líneas celulares con respecto al tratamiento con 17-AAG, uno que responde bien y muestra sensibilidad a 17-AAG, y otro que muestra una menor respuesta al tratamiento con 17-AAG. Además, estas líneas celulares también se diferencian por sus valores de IC_{50} . Teniendo en cuenta este hecho, decidimos elegir un valor de IC_{50} intermedio entre ambos grupos celulares como es 1 μ M, para distinguir entre líneas celulares sensibles a 17-AAG y líneas celulares resistentes. Aquellas líneas celulares con una IC_{50} inferior a 1 μ M se consideraron sensibles a 17-AAG, mientras que las líneas cuya IC_{50} es superior a 1 μ M se consideraron resistentes a este inhibidor. Las diferencias entre ambos grupos comienzan a observarse a bajas concentraciones de 17-AAG, y se hace notable a partir de una concentración de 0,5 μ M (Figura 29), por lo que esta concentración nos pareció apropiada para la realización de los siguientes experimentos.

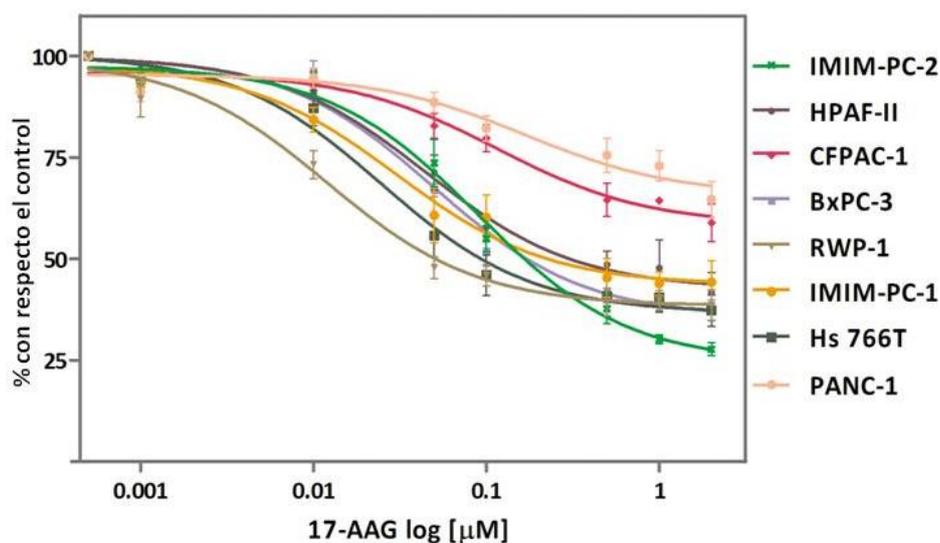


Figura 29: Efecto de 17-AAG sobre la proliferación celular en las líneas celulares de CP. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de 17-AAG (0,001-2 μ M), durante 72 horas. Cada punto representa el promedio de la proliferación \pm el error estándar de la media (SEM) de diferentes experimentos ($n \geq 6$), con respecto al control, obtenido mediante ensayos MTT.

Línea celular CP	% Inhibición con 0,5 μM	% Inhibición con 2 μM	IC ₅₀ [μM]
RWP-1	60,6 \pm 3,4	61,4 \pm 3,8	0,012
Hs 766T	59,2 \pm 5,1	62,8 \pm 3,9	0,025
IMIM-PC-1	54,7 \pm 4,8	55,8 \pm 5,4	0,031
HPAF-II	51,5 \pm 3,6	58,3 \pm 4,9	0,044
BxPC3	58,1 \pm 2,8	62,7 \pm 2,6	0,049
IMIM-PC-2	62,3 \pm 3,7	72,3 \pm 1,6	0,089
CFPAC-1	35,5 \pm 4,1	41,3 \pm 4,7	> 2
PANC-1	24,5 \pm 4,2	35,4 \pm 4,5	> 2

Tabla 16: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CP y su valor de IC₅₀. En la tabla se muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando las células fueron tratadas con una concentración 0,5 y 2 μM de 17-AAG, y los valores de IC₅₀. Todos los datos se obtuvieron a través de la curva sigmoidea para cada línea representada en la figura 29. La línea en color rojo separa las líneas celulares cuya IC₅₀ es menor de 1 μM , de las que es mayor de 1 μM .

Los ensayos de proliferación en las líneas de CCR también mostraron una disminución de la proliferación de las líneas celulares de forma concentración-dependiente cuando eran tratadas con concentraciones crecientes de 17-AAG (0,001-2 μM) durante 72 horas. También se observa una respuesta diferencial de las líneas celulares de CCR frente a 17-AAG (Figura 30).

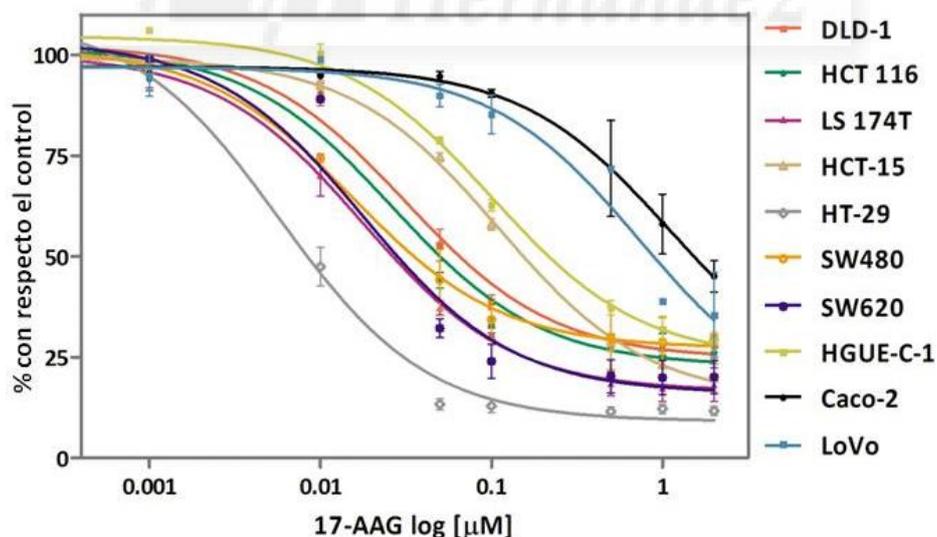


Figura 30: Efecto de 17-AAG sobre la proliferación celular en líneas celulares de CCR. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de 17-AAG (0,001-2 μM), durante 72 horas. Cada punto representa el promedio de la proliferación \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 6$), con respecto al control, obtenido mediante ensayos MTT.

Si tenemos en cuenta los valores de IC₅₀ obtenidos para las líneas celulares de CCR tras el tratamiento con 17-AAG (Tabla 17), se observa que la mayoría de las líneas

celulares presentaban una IC_{50} menor de $1 \mu M$ (en orden de menor a mayor IC_{50} : **HT-29**, **SW480**, **SW620**, **LS 174T**, **HCT 116**, **DLD-1**, **HGUE-C-1**, **HCT-15** y **LoVo**), y que solamente había una línea celular cuya IC_{50} era mayor de $1 \mu M$, **Caco-2**. Del mismo modo que hicimos en las líneas celulares de CP y teniendo en cuenta la concentración $1 \mu M$ como el valor de IC_{50} como referencia para distinguir las diferentes respuestas de las células frente a 17-AAG, las líneas celulares de CCR con una IC_{50} menor de $1 \mu M$ fueron consideradas como sensibles a 17-AAG, y la única línea celular con una IC_{50} mayor de $1 \mu M$, **Caco-2**, fue considerada resistente. Hay que apuntar que la diferente respuesta a 17-AAG entre la línea celular **LoVo** y **Caco-2** es moderada ya que la línea celular **LoVo** tiene una IC_{50} próxima a $1 \mu M$ ($IC_{50}=0,738$), acercándose al comportamiento de línea celular **Caco-2** ($IC_{50}=1,095$) (Tabla 17). Por esto, la línea celular **LoVo** fue considerada de sensibilidad intermedia a 17-AAG, ya que en estos ensayos responde a 17-AAG, pero no tan considerablemente como es resto de las líneas celulares sensibles.

Línea celular CCR	% Inhibición con $0,5 \mu M$	% Inhibición con $2 \mu M$	IC_{50} [μM]
HT-29	$88,4 \pm 1,1$	$88,4 \pm 1,0$	0,006
SW480	$70,2 \pm 7,8$	$70,5 \pm 5,5$	0,015
SW620	$79,7 \pm 4,1$	$79,9 \pm 4,1$	0,017
LS 174T	$81,5 \pm 2,9$	$81,8 \pm 4,1$	0,018
HCT 116	$71,4 \pm 2,0$	$73,8 \pm 2,8$	0,026
DLD-1	$71,8 \pm 1,6$	$72,1 \pm 2,6$	0,031
HGUE-C-1	$62,8 \pm 1,8$	$71,1 \pm 2,2$	0,101
HCT-15	$71,2 \pm 2,1$	$80,2 \pm 3,3$	0,111
LoVo	$28,3 \pm 0,5$	$64,6 \pm 10,6$	0,738
Caco-2	$28,2 \pm 11,9$	$54,9 \pm 3,9$	1,095

Tabla 17: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CCR y su valor de IC_{50} . En la tabla se muestran el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando las células fueron tratadas con una concentración $0,5$ y $2 \mu M$ de 17-AAG, y los valores de IC_{50} . Todos los datos se obtuvieron a través de la curva sigmoidea para cada línea representada en la figura 30. La línea en color rojo separa las líneas celulares cuya IC_{50} es menor de $1 \mu M$, de las que es mayor de $1 \mu M$.

2.1.2 Efecto antiproliferativo de NVP-AUY922

En general, todas las líneas celulares estudiadas de CP presentaron una importante inhibición del crecimiento cuando eran tratadas con concentraciones crecientes de NVP-AUY922 ($0,001$ - $2 \mu M$) durante 72 horas (Figura 31), de forma concentración-dependiente. De hecho, con este fármaco, los valores de IC_{50} de las

Resultados

líneas celulares de CP fueron, para todos los casos, menores de 1 μM , y siguiendo el mismo criterio utilizado para el fármaco 17-AAG, todas ellas fueron consideradas sensibles a NVP-AUY922 (Tabla 18). En orden de menor a mayor IC_{50} , las líneas celulares de CP se disponen de este modo: **RWP-1**, **IMIM-PC-1**, **CFPAC-1**, **PANC-1**, **IMIM-PC-2**, **HPAF-II**, **Hs 766T** y **BxPC3** (Tabla 18). Si se observa lo que ocurre a una concentración intermedia, como puede ser 0,1 μM , se aprecia que las líneas celulares han sufrido una inhibición considerable del crecimiento, con valores que oscilan entre el 40-65% (Tabla 18).

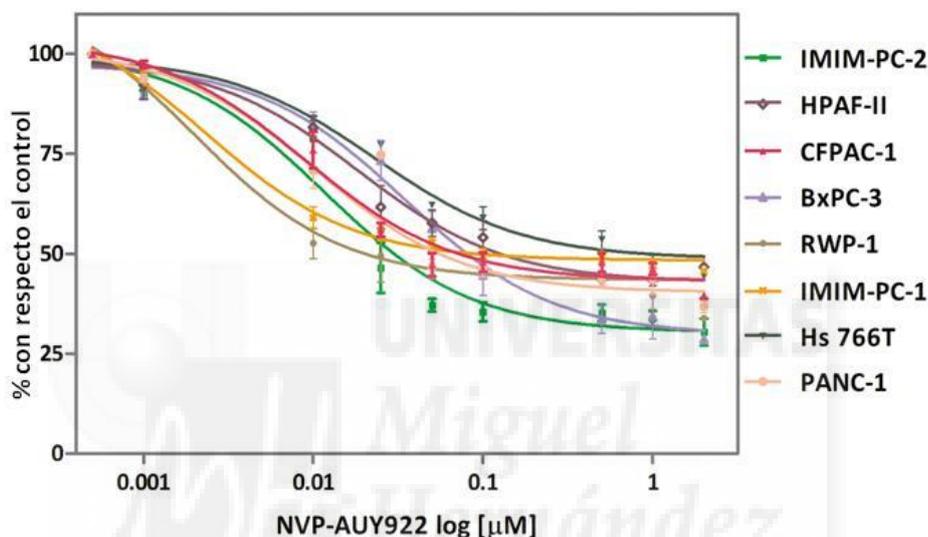


Figura 31: Efecto de NVP-AUY922 sobre la proliferación celular en líneas celulares de CP. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de NVP-AUY922 (0,001-2 μM), durante 72 horas. Cada punto representa el promedio de la proliferación \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 6$), con respecto al control, obtenido mediante ensayos MTT.

Línea celular CP	% Inhibición con 0,1 μM	% Inhibición con 2 μM	IC_{50} (μM)
RWP-1	53,1 \pm 3,2	66,1 \pm 1,0	0,002
IMIM-PC-1	49,9 \pm 1,2	54,2 \pm 0,5	0,002
CFPAC-1	52,1 \pm 2,4	60,4 \pm 0,8	0,009
PANC-1	53,3 \pm 2,5	63,2 \pm 1,5	0,010
IMIM-PC-2	64,5 \pm 2,3	69,6 \pm 3,4	0,012
HPAF-II	45,9 \pm 4,2	53,3 \pm 1,1	0,018
Hs 766T	41,1 \pm 2,9	55,6 \pm 1,0	0,023
BxPC3	55,2 \pm 5,2	71,3 \pm 1,2	0,034

Tabla 18: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CP y su valor de IC_{50} . En la tabla se muestran el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando las células fueron tratadas con una concentración 0,1 y 2 μM de NVP-AUY922, y los valores de IC_{50} . Todos los datos se obtuvieron a través de la curva sigmoidea para cada línea representada en la figura 31.

Para las líneas celulares de CCR, la inhibición de la proliferación producida por NVP-AUY922 (0,001-2 μM) durante 72 horas de tratamiento también fue bastante significativa y concentración-dependiente (Figura 32), con una disminución del crecimiento entre el 80-90% para la mayoría de las líneas celulares analizadas a una concentración 2 μM (Tabla 19).

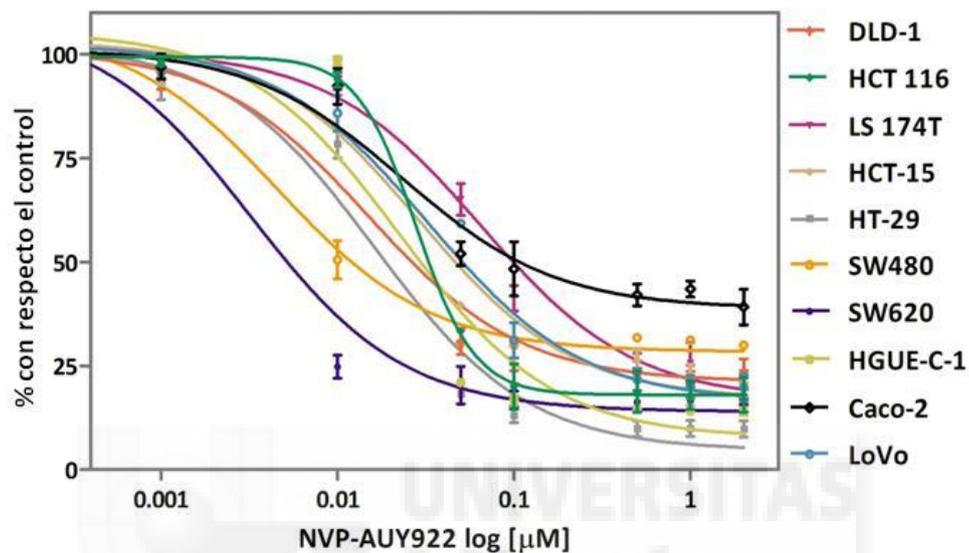


Figura 32: Efecto de NVP-AUY922 sobre la proliferación celular en líneas celulares de CCR. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de NVP-AUY922 (0,001-2 μM), durante 72 horas. Cada punto representa el promedio de la proliferación \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 6$), con respecto al control, obtenido mediante ensayos MTT.

Además, al igual que ocurre en las líneas celulares de CP, la IC_{50} de todas las líneas celulares de CCR fue inferior a 1 μM , por lo que todas las líneas celulares se consideraron sensibles a NVP-AUY922 (Tabla 19). En orden de menor a mayor IC_{50} , las células quedaban del siguiente modo: **SW620**, **SW480**, **DLD-1**, **HT-29**, **HGUE-C-1**, **Caco-2**, **HCT 116**, **HCT-15**, **LoVo** y **LS 174T** (Tabla 19). A una concentración intermedia como 0,1 μM , la mayoría de las líneas celulares de CCR presentan una disminución de aproximadamente un 60-80% de su crecimiento. La concentración 0,1 μM fue seleccionada para realizar el resto de experimentos, tanto con las líneas celulares de CP como de CCR.

De manera interesante, podemos decir que ninguna línea celular de CP o de CCR mostró una baja respuesta a NVP-AUY922, ya que en todas se producía una disminución considerable de la proliferación tras el tratamiento con este inhibidor.

Resultados

Además, ninguna línea celular analizada presenta un valor de IC₅₀ superior a 1 μM (Tabla 18 y 19), valor seleccionado en este trabajo para clasificar las células como sensibles o resistentes al tratamiento frente a los inhibidores de HSP90 estudiados, para el rango de concentraciones utilizadas en los experimentos de proliferación (0,001-2 μM).

Línea celular CCR	% Inhibición con 0,1 μM	% Inhibición con 2 μM	IC ₅₀ (μM)
SW620	82,8 ± 1,8	83,6 ± 0,9	0,003
SW480	70,2 ± 7,8	70,5 ± 5,5	0,005
DLD-1	73,1 ± 3,1	76,1 ± 2,8	0,015
HT-29	86,9 ± 1,8	90,2 ± 1,9	0,016
HGUE-C-1	83,3 ± 1,2	86,0 ± 0,9	0,023
Caco-2	51,6 ± 6,5	60,9 ± 4,3	0,024
HCT 116	80,0 ± 5,5	82,0 ± 4,2	0,028
HCT-15	74,7 ± 4,5	80,8 ± 1,7	0,029
LoVo	68,8 ± 4,3	80,2 ± 3,2	0,033
LS 174T	58,7 ± 3,1	82,5 ± 1,8	0,065

Tabla 19: Porcentaje de inhibición de las líneas celulares de CCR y su valor de IC₅₀. En la tabla se muestran el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando las células fueron tratadas con una concentración 0,1 y 2 μM de NVP-AUY922, y los valores de IC₅₀. Todos los datos se obtuvieron a través de la curva sigmoidea para cada línea representada en la figura 32.

2.1.3 Efectos antiproliferativos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre cultivos primarios

En general, los cultivos primarios procedentes de tumores colorrectales de pacientes también mostraron una inhibición del crecimiento cuando fueron tratados con 17-AAG o NVP-AUY922, aunque la reducción de la proliferación en estos cultivos fue menor que la observada en las líneas celulares de CCR incluidas en el estudio. En total, fueron analizados 16 cultivos primarios (Tabla 8), los cuales fueron tratados con dos concentraciones diferentes de cada fármaco. Basándonos en los experimentos preliminares realizados en las líneas celulares de CCR, se decidió utilizar una concentración baja de 17-AAG (0,5 μM) y de NVP-AUY922 (0,1 μM); y una concentración más alta, de 2 y 1 μM, respectivamente. El promedio de la inhibición de la proliferación fue de 35,9 ± 2,2% y de 42,7 ± 2,2%, cuando los cultivos fueron tratados con 0,5 y 2 μM de 17-AAG; y de 43,9 ± 2,7% y de 45,3 ± 2,5%, cuando fueron tratados con 0,1 y 1 μM de NVP-AUY922 (Figura 33).

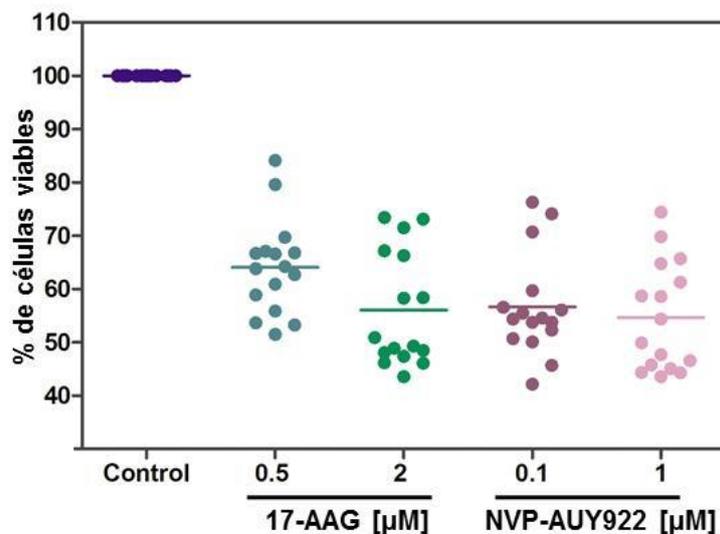


Figura 33: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la proliferación celular de cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes con CCR. Los cultivos primarios (n=16) fueron tratados con 0,5 y 2 µM de 17-AAG, y 0,1 y 1 µM de NVP-AUY922, durante 72 horas. Cada punto representa el promedio de la proliferación de diferentes experimentos (n≥3), con respecto al control, para cada cultivo, medido mediante tinción con cristal violeta.

En algunos cultivos primarios, en concreto en cuatro de ellos: **HCUVA-CC-1**, **HCUVA-CC-34**, **HCUVA-CC-1^{CT}**, **HCUVA-CC-3^{CT}**, también se realizó un curso dosis-respuesta con diferentes concentraciones de ambos fármacos. El rango de concentraciones empleado fue superior al utilizado en las líneas celulares (0,01- 10 µM), dado que los resultados obtenidos en el ensayo anterior (Figura 33) indicaron que la reducción de la proliferación en los cultivos primarios no era tan pronunciada como en las líneas celulares de CCR. En los cuatro cultivos, el crecimiento fue inhibido por ambos inhibidores de forma concentración-dependiente, al igual que se observa en las líneas celulares de CCR (Figura 30 y 32). Si examinamos el efecto de 17-AAG, la disminución de la proliferación es bastante significativa en el cultivo primario **HCUVA-CC-3^{CT}**, con casi un 80% de reducción a la máxima concentración utilizada (10 µM), mientras que el cultivo **HCUVA-CC-34** es el que peor responde al tratamiento con 17-AAG. Con respecto a los valores de IC₅₀, decir que todos los cultivos muestran un valor de IC₅₀ inferior a 1 µM, por lo que al igual que las líneas celulares de CCR, fueron considerados sensibles a 17-AAG (Tabla 20), a excepción del cultivo **HCUVA-CC-34** cuyo valor de IC₅₀ fue superior a 1 µM, y por tanto se consideró resistente a 17-AAG (Tabla 20).

Resultados

Por otro lado, si se observa el comportamiento de los cultivos con respecto a NVP-AUY922, se aprecia que sucedía algo muy parecido que tras el tratamiento con 17-AAG. El cultivo más afectado por el tratamiento fue **HCUVA-CC-3^{CT}**, con una disminución de la proliferación de $74,8 \pm 6,1\%$ a la máxima concentración utilizada de NVP-AUY922 ($10 \mu\text{M}$), y el menos afectado fue el cultivo **HCUVA-CC-34**, con una disminución de la proliferación de un $40,4 \pm 7,8$ a esta misma concentración (Tabla 20).

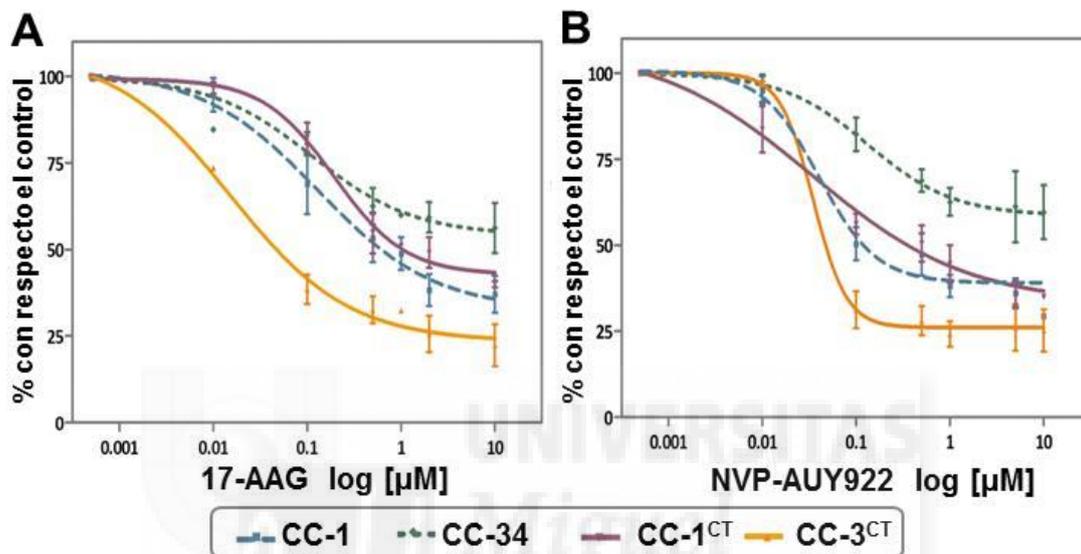


Figura 34: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la proliferación celular en cuatro cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes con CCR: HCUVA-CC-1 (CC-1), HCUVA-CC-34 (CC-34), HCUVA-CC-1^{CT} (CC-1^{CT}) y HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT}). Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes (0,01-10 μM) de 17-AAG (A) y NVP-AUY922 (B) durante 72 horas. Cada punto representa el promedio de la proliferación \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$), con respecto al control, obtenido mediante tinción con cristal violeta.

Los valores de IC_{50} de los cultivos primarios analizados también fueron inferiores a $1 \mu\text{M}$ tras el tratamiento con NVP-AUY922, y por tanto todos ellos fueron considerados sensibles a este inhibidor, según el mismo criterio utilizado para las líneas celulares de CCR, a excepción del cultivo **HCUVA-CC-34**, con un valor de IC_{50} mayor de $1 \mu\text{M}$ (Figura 34, Tabla 20). Esto es muy interesante, ya que **HCUVA-CC-34** son el modelo celular, considerando todas las líneas celulares de CP y de CCR y los cultivos estudiados en este trabajo que peor responden al tratamiento con NVP-AUY922 (Tablas 18, 19 y 20), siendo este hecho muy evidente cuando fue tratado con $0,1 \mu\text{M}$ de NVP-AUY922, donde el inhibidor solamente es capaz de producir una disminución de la proliferación de un $17,8 \pm 4,8\%$ (Tabla 20).

17-AAG			
Cultivo primario	% Inhibición con 0,5 μ M	% Inhibición con 10 μ M	IC ₅₀ [μ M]
HCUVA-C-3 ^{CT}	67,4 \pm 3,9	77,7 \pm 6,1	0,016
HCUVA-C-1	46,7 \pm 6,9	62,9 \pm 5,3	0,130
HCUVA-C-1 ^{CT}	45,2 \pm 5,9	59,9 \pm 0,9	0,194
HCUVA-C-34	37,5 \pm 5,3	43,8 \pm 7,2	> 1
NVP-AUY922			
Cultivo primario	% Inhibición con 0,1 μ M	% Inhibición con 10 μ M	IC ₅₀ [μ M]
HCUVA-C-1 ^{CT}	43,8 \pm 3,0	65,0 \pm 1,0	0,034
HCUVA-C-3 ^{CT}	68,8 \pm 5,4	74,8 \pm 6,1	0,035
HCUVA-C-1	49,6 \pm 4,8	70,6 \pm 0,1	0,040
HCUVA-C-34	17,8 \pm 4,8	40,4 \pm 7,8	> 1

Tabla 20: Porcentaje de inhibición de cultivos primarios y su valor de IC₅₀. En la tabla se muestran el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando los cultivos primarios fueron tratados con una concentración 0,5 y 10 μ M de 17-AAG, y 0,1 y 10 μ M de NVP-AUY922, y sus respectivos valores de IC₅₀. Todos los datos se obtuvieron a través de la curva sigmoidea para cada línea representada en la figura 34.

2.1.4 Efectos antiproliferativos durante un curso temporal

Para estudiar con más detalle la inhibición de la proliferación celular producida por 17-AAG y NVP-AUY922, se realizó un curso temporal de 1, 3 y 6 días, donde las en las líneas celulares de CP y de CCR fueron tratadas con una concentración constante de cada fármaco. Los experimentos se llevaron a cabo en cuatro líneas celulares de CP: **IMIM-PC-1**, **IMIM-PC-2**, **CFPAC-1** y **PANC-1**; y cuatro líneas celulares de CCR: **HT-29**, **SW620**, **LoVo** y **Caco-2**. Los resultados con 17-AAG (0,5 μ M) muestran que hay dos grupos de líneas celulares que se comportaban de forma diferente, al igual que ocurrió en los ensayos dosis-respuesta. Por un lado, las líneas celulares **CFPAC-1** y **PANC-1** prácticamente no mostraban inhibición alguna, seguidas por la línea **Caco-2**, que presentó una inhibición muy leve, de solamente un 25,6 \pm 7,3% (Tabla 21, Figura 35, A). Concretamente, estas tres líneas celulares han sido consideradas resistentes frente a este inhibidor, y en estos ensayos se confirmó su baja respuesta a 17-AAG. Por otro lado, en el resto de las líneas celulares se observa una inhibición de la proliferación de aproximadamente un 60% o superior a los 6 días de tratamiento, especialmente las líneas **HT-29** y **SW620**, cuya inhibición es drástica (Tabla 21, Figura 35, B). Además, la línea celular **LoVo** presenta una inhibición del 70,5 \pm 5,7% (Tabla 21), indicando que a

Resultados

mayor tiempo de exposición a 17-AAG, su inhibición es similar a otras líneas celulares sensibles a 17-AAG, confirmando así su comportamiento sensible frente a 17-AAG. Un resultado similar a los obtenidos en los ensayos dosis-respuesta también muestra el análisis de las ocho líneas celulares tratadas NVP-AUY922 (0,1 μ M), ya que todas experimentan una inhibición de alrededor del 80% de la proliferación tras el tratamiento con NVP-AUY922, por lo que todas son sensibles frente a este inhibidor en estos experimentos (Tabla 21, Figura 35, B).

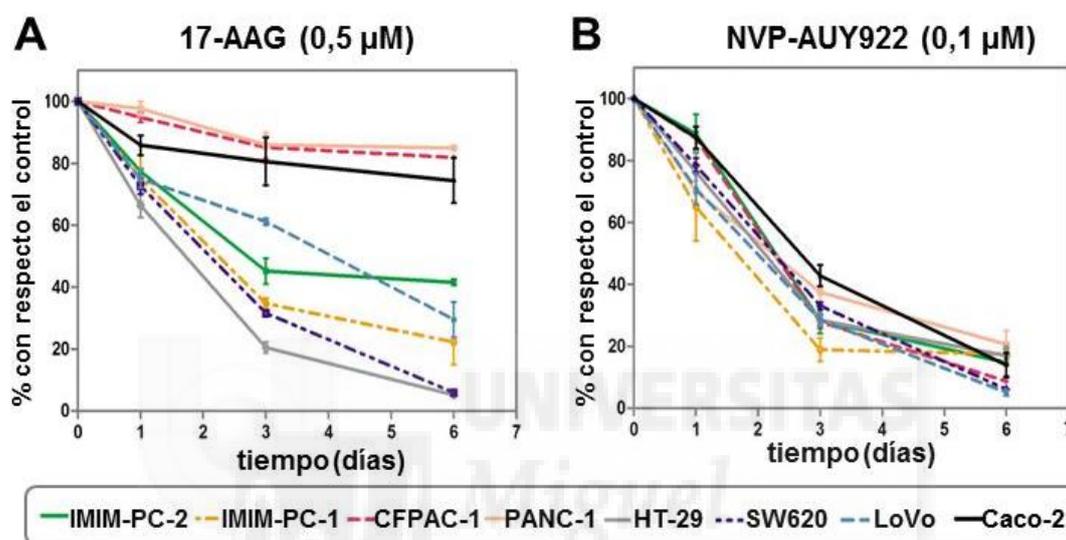


Figura 35: Curso temporal de la proliferación celular tras el tratamiento de inhibidores de HSP90. Las líneas celulares de CP (IMIM-PC-2, IMIM-PC-1, CFPAC-1 y PANC-1) y de CCR (HT-29, SW620, LoVo y Caco-2) fueron tratadas durante 1, 3 y 6 días con A) 0,5 μ M de 17-AAG o B) 0,1 μ M de NVP-AUY922. Cada punto representa el promedio de la proliferación \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$), con respecto al control, medido mediante tinción con cristal violeta.

Línea celular	17-AAG	NVP-AUY922
IMIM-PC-2	58,4 \pm 1,2	85,3 \pm 4,3
IMIM-PC-1	77,8 \pm 7,2	82,6 \pm 2,2
CFPAC-1	18,1 \pm 0,2	91,4 \pm 0,5
PANC-1	15,0 \pm 0,3	79,4 \pm 4,4
HT-29	94,8 \pm 0,5	83,1 \pm 3,0
SW620	94,1 \pm 0,2	93,9 \pm 0,6
LoVo	70,5 \pm 5,7	94,9 \pm 1,0
Caco-2	25,6 \pm 7,3	86,1 \pm 3,9

Tabla 21: Porcentaje de inhibición de ocho líneas celulares tras el tratamiento de 17-AAG y NVP-AUY922 durante 6 días. En la tabla se muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando las células fueron tratadas con una concentración 0,5 μ M de 17-AAG y 0,1 μ M de NVP-AUY922. Los datos corresponden al último punto representado en la figura 35 para cada línea celular.

2.2 Efectos sobre la proliferación celular independiente de anclaje

El ensayo *in vitro* llamado "soft agar" es una forma de analizar el crecimiento de las células tumorales sin que puedan anclarse a ninguna superficie, es decir, de forma independiente de anclaje. En este caso, las células tienen que ser capaces de crecer formando colonias dentro de un soporte blando de agar. Este ensayo es uno de los más rigurosos para determinar la capacidad de transformación maligna de las células, aunque no todas las células tumorales presentan esta propiedad. Para la realización de este ensayo primero se determinó si efectivamente las líneas celulares eran capaces de formar colonias en condiciones de crecimiento normales, en presencia de suero y sin fármacos (Figura 36), y después se valoró el efecto de los inhibidores, 17-AAG y NVP-AUY922, sobre las mismas.

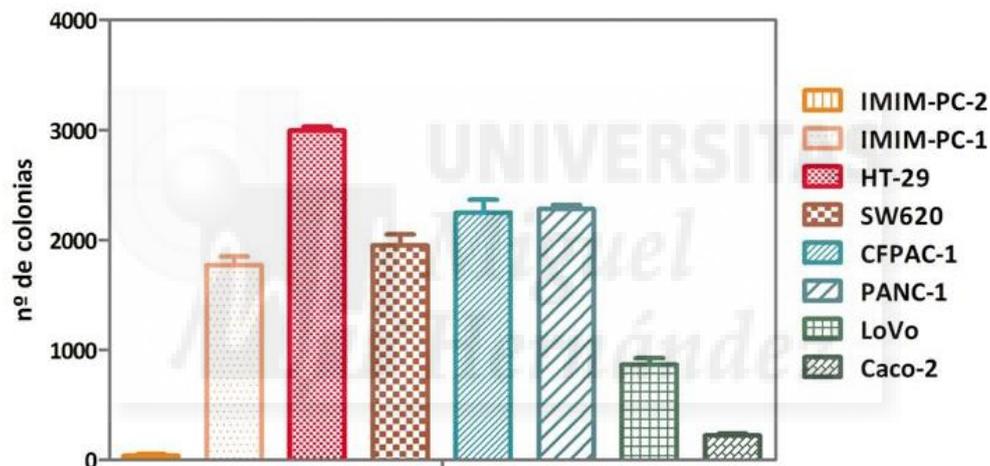


Figura 36: Número de colonias formadas por varias líneas celulares. Número de colonias formadas durante 14 días, en cada una de las ocho líneas celulares seleccionadas sin ningún tipo de tratamiento. Cada barra representa el promedio de las colonias \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$).

2.2.1 Efectos de 17-AAG sobre la formación de colonias

Para evaluar el efecto de 17-AAG sobre la formación de colonias se eligieron líneas celulares sensibles al tratamiento con 17-AAG en los ensayos de proliferación celular, y líneas que no lo eran. Según los resultados de los ensayos de proliferación, se seleccionaron tres líneas sensibles a 17-AAG ($IC_{50} < 1 \mu M$): una línea celular de CP, **IMIM-PC-1**, y dos de CCR, **HT-29** y **SW620**; una línea celular de CCR con una sensibilidad intermedia a 17-AAG, **LoVo**; y tres líneas celulares resistentes a 17-AAG ($IC_{50} > 1 \mu M$): dos líneas celulares de CP, **CFPAC-1** y **PANC-1**, y una de CCR, **Caco-2**. La línea celular de CP **IMIM-PC-2** fue descartada para el ensayo por el bajo número de colonias que

Resultados

formaba (Figura 36). Los resultados tras 14 días de tratamiento con 0,5 μM de 17-AAG mostraron que la inhibición de la formación de colonias en las líneas **IMIM-PC-1**, **HT-29** y **SW620** fue prácticamente total, con un 99% de inhibición de la formación de colonias (Figura 37 y Figura 39). En el caso de la línea celular **LoVo** también se observa una gran reducción de la formación de las colonias, con un $94,5\% \pm 4,2$ (Figura 37), por lo que responden al tratamiento con 17-AAG. En la línea **Caco-2** las colonias formadas fueron inhibidas hasta un $59,7\% \pm 6,7$ (Figura 37). En este tipo de ensayo, **Caco-2** presenta una respuesta parcial a 17-AAG. Todo lo contrario ocurrió en las líneas celulares de CP, **CFPAC-1** y **PANC-1**, que mostraron resistencia a 17-AAG, con un porcentaje muy bajo de inhibición del número de colonias ($8,0 \pm 7,9\%$ y $4,7 \pm 2,5\%$, respectivamente) (Figura 37 y Figura 39).

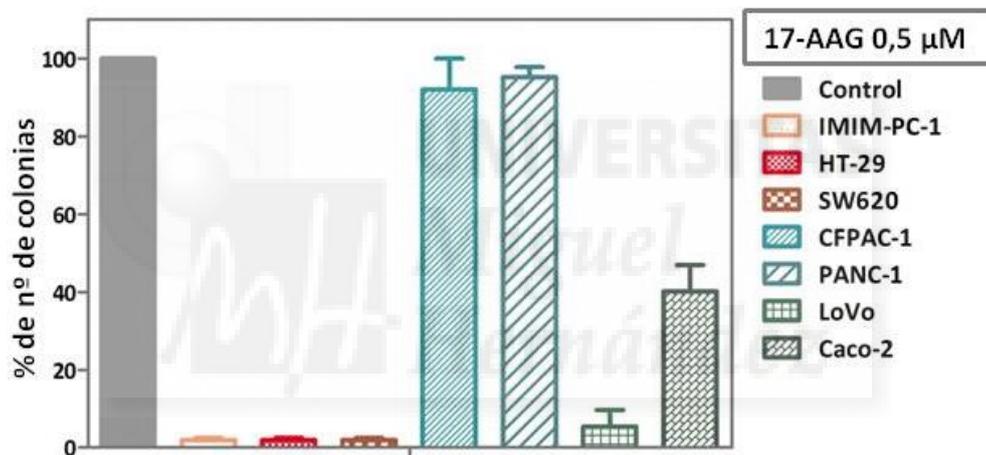


Figura 37: Efecto de 17-AAG en la formación de colonias en líneas celulares. Porcentaje del nº de colonias, tratadas con DMSO (control) o 0,5 μM de 17-AAG durante 14 días, en cada una de las siete líneas celulares. Cada barra representa el promedio de las colonias \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$). Se representa un solo control, correspondiente al número máximo de colonias para cada línea celular (100%).

2.2.2 Efectos de NVP-AUY922 sobre la formación de colonias

Para evaluar el efecto de NVP-AUY922 sobre la formación de colonias se seleccionaron las mismas líneas celulares que fueron tratadas con 17-AAG. Sin embargo, con este inhibidor todas las células analizadas presentaron una reducción casi total del número de colonias formadas tras el tratamiento con NVP-AUY922, a una concentración de 0,1 μM . (Figura 38). En concreto, la formación de colonias fue inhibida superando el 85% de reducción en todas las líneas celulares, especialmente en las líneas de CP **IMIM-PC-1** y **PANC-1**, donde la reducción fue de un $99 \pm 0,5\%$ en ambos casos

(Figura 38 y 39), y en la línea celular de CCR **LoVo**, en la que la inhibición del número de colonias alcanza un $98,8 \pm 0,4\%$ (Figura 38).

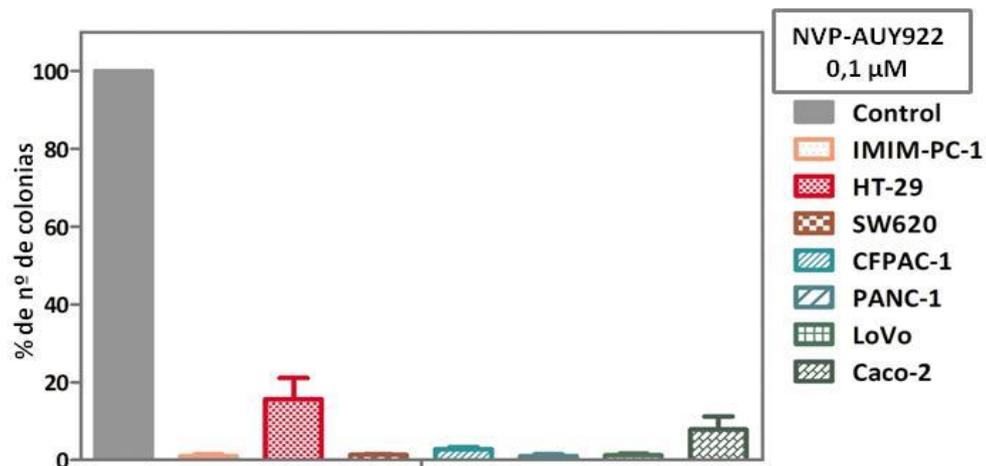


Figura 38: Efecto de NVP-AUY922 en la formación de colonias en líneas celulares. Porcentaje del n° de colonias, tratadas con DMSO (control) o $0,1 \mu\text{M}$ de NVP-AUY922 durante 14 días, en cada una de las siete líneas celulares. Cada barra representa el promedio de las colonias \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$). Se representa un solo control, correspondiente al número máximo de colonias para cada línea celular (100%).

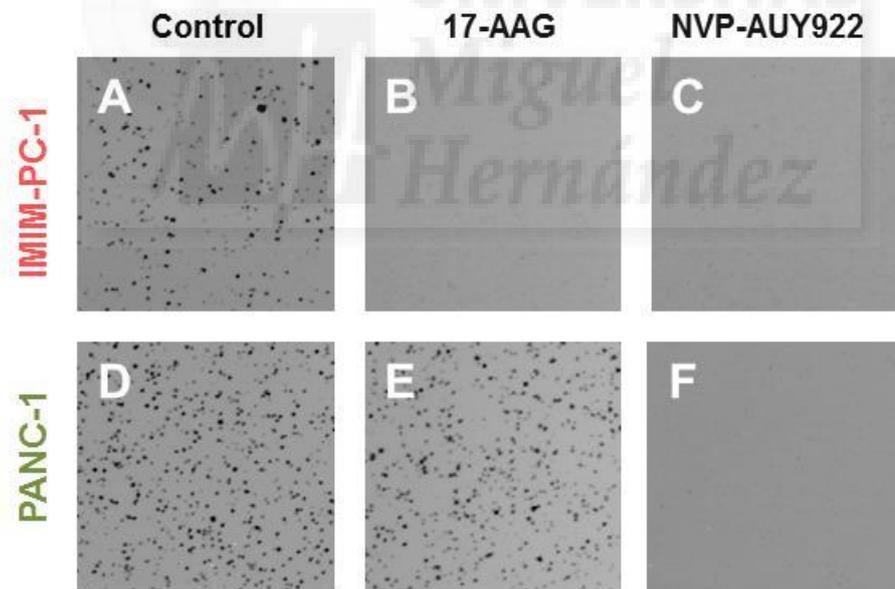


Figura 39: Imágenes escaneadas de las colonias formadas por las líneas IMIM-PC-1 y PANC-1 tratadas con 17-AAG y NVP-AUY922. A) y D) Colonias de las líneas IMIM-PC-1 y PANC-1 tratadas con DMSO (control), respectivamente. B) y E) Colonias de las líneas IMIM-PC-1 y PANC-1 tratadas con $0,5 \mu\text{M}$ de 17-AAG. C) y F) Colonias de las líneas IMIM-PC-1 y PANC-1 tratadas con $0,1 \mu\text{M}$ de NVP-AUY922. Las colonias fueron escaneadas después de 14 días de tratamiento y tras la adición e incubación con INTZ durante 16 horas.

2.2.3 Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la formación de colonias en cultivos primarios

Para analizar los efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la formación de colonias en los cultivos primarios, primero se determinó si los cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes, previamente evaluados en los ensayos de proliferación, presentaban esta propiedad. Entre los cultivos primarios también existía una gran diversidad con respecto al número de colonias que formaba cada cultivo. Uno de ellos formaba una cantidad muy pequeña de colonias, el cultivo HCUVA-CC-1^{CT}, mientras que los otros tres cultivos, HCUVA-CC-1, HCUVA-CC-3^{CT} y HCUVA-CC-34, formaban un número considerable de colonias (Figura 40).

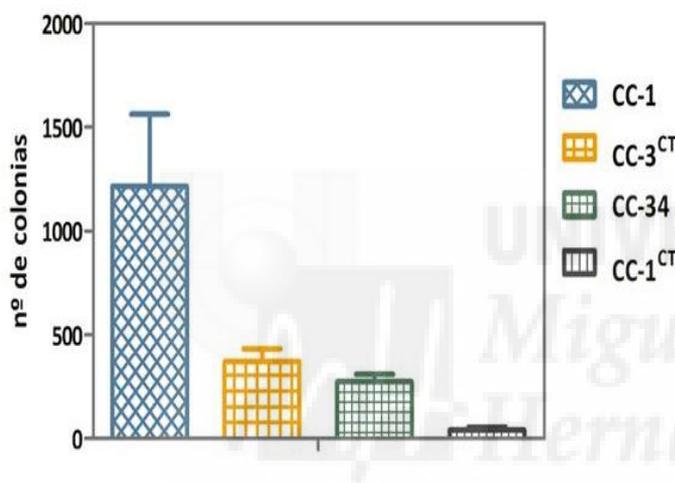


Figura 40: Número de colonias formadas por cultivos primarios. Número de colonias formadas durante 14 días, en los cultivos primarios: HCUVA-CC-1 (CC-1), HCUVA-CC-34 (CC-34), HCUVA-CC-1^{CT} (CC-1^{CT}) y HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT}), sin ningún tipo de tratamiento. Cada barra representa el promedio de las colonias \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$).

Para estudiar el efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 se utilizaron dos concentraciones diferentes de cada fármaco, una concentración baja y una concentración alta. Los cultivos HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3^{CT} presentaron una reducción de la formación de colonias mayor del 80% para ambos fármacos, y para ambas concentraciones (Figura 41 y Figura 42). Por otro lado, en el cultivo HCUVA-CC-34, la inhibición de la formación de colonias tras el tratamiento fue aproximadamente de un 60% con 17-AAG, tanto con 0,5 μ M como con 2 μ M, y con NVP-AUY922 fue de un $14,1 \pm 1,8\%$ a una concentración de 0,1 μ M, y de un $51,5 \pm 4,9\%$ a una concentración de 1 μ M (Figura 41 y Figura 42). En este cultivo, ambos inhibidores disminuyeron el número de colonias, aunque esta disminución fue parcial tras el tratamiento con 17-AAG, y muy leve tras el tratamiento con NVP-AUY922 a una concentración baja. Este cultivo tampoco respondió bien al efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 en los ensayos de proliferación dependiente de anclaje (Figura 34).

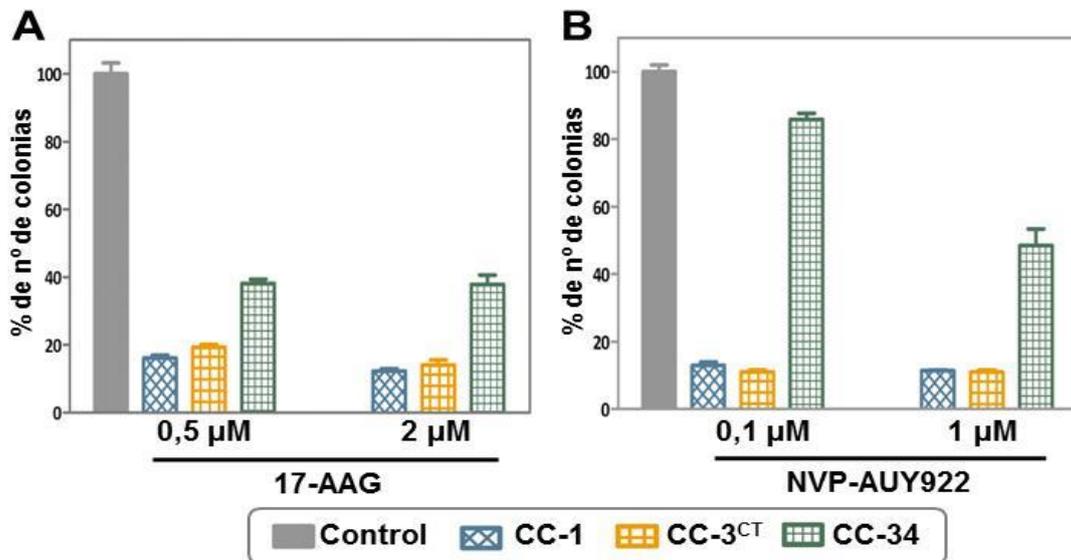


Figura 41: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 en la formación de colonias de cultivos primarios. Los cultivos derivados de muestras tumorales de pacientes con CCR: HCUVA-CC-1 (CC-1), HCUVA-CC-34 (CC-34), HCUVA-CC-1^{CT} (CC-1^{CT}) y HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT}) fueron tratados con DMSO (control), o 0,5 μ M y 2 μ M de 17-AAG (A), o 0,1 μ M y 1 μ M de NVP-AUY922 (B), durante 14 días, y el porcentaje del número de colonias formadas ha sido representado. Cada barra representa el promedio de las colonias \pm SEM de diferentes experimentos ($n \geq 3$). Se representa un solo control, correspondiente al número máximo de colonias para cada cultivo (100%).

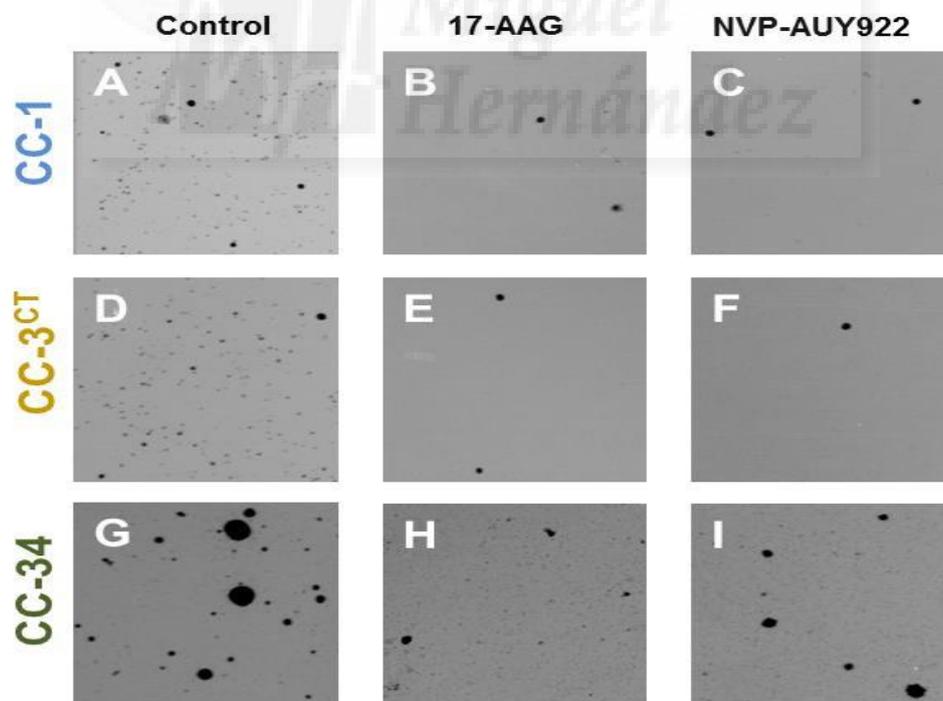


Figura 42: Imágenes escaneadas de las colonias formadas por cultivos primarios. A), D) y G) Colonias de los cultivos CC-1, CC-3^{CT} y CC-34 tratados con DMSO (control). B), E) y H) Colonias de los cultivos CC-1, CC-3^{CT} y CC-34 tratados con 17-AAG (2 μ M). C), F) e I) Colonias de los cultivos CC-1, CC-3^{CT} y CC-34 tratados con NVP-AUY922 (1 μ M). Los cultivos primarios fueron escaneados después de 14 días de tratamiento, tras la adición e incubación con INTZ durante 16 horas.

3. Efectos de la inhibición de HSP90 sobre los niveles de expresión de proteínas clientes o sus dianas relacionadas con las rutas PI3-K/Akt y MAPK

Existen numerosas proteínas descritas como "clientes" de HSP90, es decir, proteínas que dependen de esta chaperona para completar algún proceso post-traduccion. Si HSP90 es inhibida, no puede realizar su función, y sus proteínas clientes son degradadas vía proteosoma. Siguiendo este planteamiento, se investigó si los inhibidores 17-AAG y NVP-AUY922 eran capaces de disminuir los niveles de expresión de proteínas clientes de HSP90 y/o proteínas relacionadas con ellas, que forman parte de rutas de señalización tan importantes como la ruta PI3-K/Akt o la ruta MAPK. Dentro de estas rutas, son proteínas clientes de HSP90 algunos RTK capaces de activarlas, como los receptores HER, las quinasas Raf-1 (C-Raf), B-Raf, Akt, mTOR y p70S6K. Para determinar los efectos de la inhibición de HSP90 sobre estas vías de señalización, líneas celulares de CP y de CCR fueron tratadas con 17-AAG (0,5 μ M) y con NVP-AUY922 (0,1 μ M) a diferentes tiempos. Obtenidos los extractos, se procedió a la realización de ensayos de Western Blot.

3.1 Efectos de 17-AAG sobre proteínas relacionadas con HSP90

En primer lugar, se analizó lo ocurrido tras el tratamiento con 17-AAG (0,5 μ M). Inicialmente, se estudiaron los niveles de expresión de los miembros de la familia de receptores HER (EGFR, HER2, HER3 y HER4) en dos líneas de CP (**IMIM-PC-2** y **PANC-1**) y en dos líneas de CCR (**HT-29** y **Caco-2**) tratadas durante 24 y 48 horas con 17-AAG. Tras ello, se estudió la expresión de proteínas que se encuentran por debajo de los receptores HER, y que forman parte de la ruta PI3-K/Akt, como es el caso de Akt, y de la ruta MAPK, como Erk 1/2 y sus niveles de fosforilación (Thr202/ Tyr204). Aunque Erk 1/2 no es una proteína cliente de HSP90, su fosforilación indica si la cascada MAPK está activada o no. Los experimentos revelaron dos tipos de respuesta. Por un lado, las líneas celulares **IMIM-PC-2** y **HT-29**, sensibles a 17-AAG en los ensayos de proliferación, mostraron una disminución en los niveles de expresión de la mayoría de los receptores HER, Akt total, y la fosforilación de Erk 1/2 (Figura 43). Dentro de los receptores HER, HER4 fue el menos inhibido por el efecto de 17-AAG. Por otro lado, las líneas celulares resistentes a 17-AAG en los ensayos de proliferación, **PANC-1** y **Caco-2**, apenas mostraron cambios en los niveles de expresión de las proteínas analizadas. Solamente

se observa una ligera disminución en los niveles de HER2 y HER3 en ambas líneas, y de Akt tras 48 horas de tratamiento en la línea **Caco-2**, aunque los niveles de expresión de la fosforilación de Erk 1/2 no fueron alterados en ninguno de los casos (Figura 43).

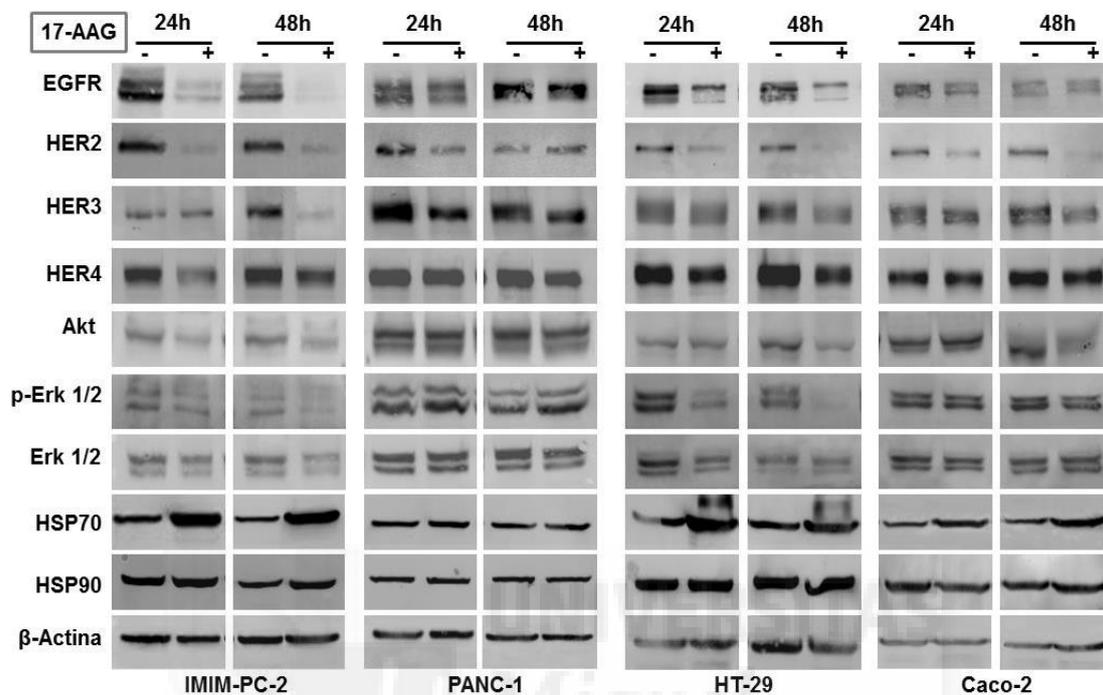


Figura 43: Efectos de 17-AAG sobre los niveles de expresión en proteínas relacionadas con HSP90. Las líneas celulares de CP IMIM-PC-2 y PANC-1, y las líneas celulares de CCR, HT-29 y Caco-2 se cultivaron y se trataron con DMSO (-) o con 0,5 μ M de 17-AAG (+), durante 24 o 48 horas. Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente a las proteínas: EGFR, HER2, HER3, HER4, Akt, p-Erk 1/2, Erk 1/2, HSP70 y HSP90. β -actina se utilizó como control de carga para todas las condiciones.

Además del estudio de proteínas relacionadas con vías de señalización, también se determinó el efecto de 17-AAG sobre la expresión de la chaperona HSP70. El incremento de la expresión de HSP70 ha sido descrito como un biomarcador de respuesta de la inhibición de la función de HSP90. Al analizar su expresión en las líneas tratadas con 17-AAG, se observa un claro aumento de expresión HSP70 en las líneas sensibles **IMIM-PC-2** y **HT-29**. También se observa un leve aumento de la expresión de HSP70 en la línea **Caco-2**, sobre todo tras 48 horas de tratamiento, quizás relacionado con los leves cambios que 17-AAG produce también en los niveles de otras proteínas en esta línea celular. Por último, se analizaron los niveles de HSP90, pero el tratamiento con 17-AAG en las líneas celulares analizadas no produjo cambios en sus niveles de expresión.

3.2 Efectos de NVP-AUY922 sobre proteínas relacionadas con HSP90

Dado que los datos obtenidos en los ensayos de proliferación indicaban que todas las líneas celulares de CP y de CCR eran sensibles a NVP-AUY922, inicialmente se eligieron dos líneas de CCR, **SW620** y **Caco-2**, ambas sensibles al inhibidor de HSP90, para observar el efecto que producía NVP-AUY922 (0,1 μ M). Los experimentos mostraron una disminución significativa de los niveles de expresión de las proteínas estudiadas (EGFR, HER2, HER3, Akt, p-Erk 1/2 y Erk 1/2) en las dos líneas de CCR, a excepción del receptor HER4, donde la disminución en los niveles de expresión fue leve, en comparación con el resto de receptores HER (Figura 44, A).

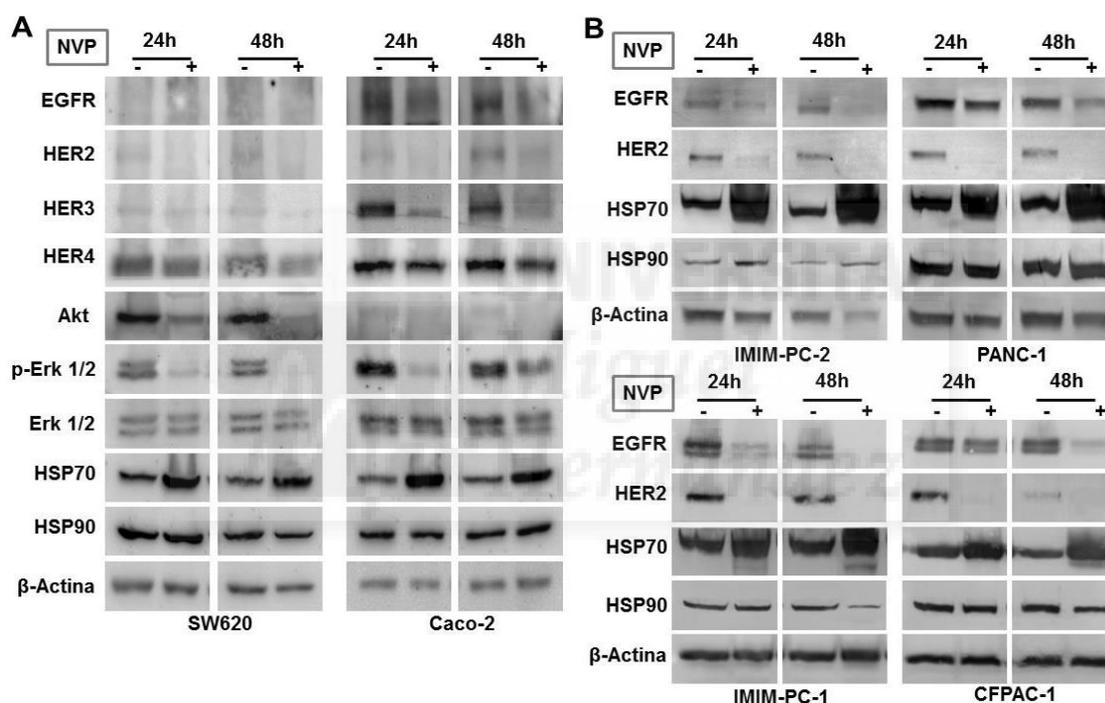


Figura 44: Efectos de NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90. Las líneas celulares de CCR, SW620 y Caco-2 (A), y las líneas de CP, IMIM-PC-2, PANC-1, IMIM-PC-1, CFPAC-1 (B), se cultivaron y posteriormente, se trataron con DMSO (-) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (NVP) (+) durante 24 o 48 horas. Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente a las proteínas: A) EGFR, HER2, HER3, HER4, Akt, p-Erk 1/2, Erk 1/2, HSP70 y HSP90 o B) EGFR, HER2, HSP70 y HSP90. β -actina se utilizó como control de carga para todas las condiciones.

Los cambios en el receptor EGFR en la línea celular **SW620** no pudieron ser valorados debido a que sus niveles de expresión son indetectables en esta línea celular. Por otro lado, también se observa un incremento de la expresión de HSP70 en ambas

líneas celulares, al contrario que la expresión de HSP90, que prácticamente no se modifica tras el tratamiento (Figura 44, A).

El efecto de NVP-AUY922 (0,1 μ M) también se estudió en varias líneas celulares de CP (**IMIM-PC-2**, **PANC-1**, **IMIM-PC1** y **CFPAC-1**), en las cuales se observa una disminución en los niveles de expresión de los receptores EGFR y HER2. Además, y al igual que ocurrió en las líneas de CCR, los niveles de expresión de HSP70 aumentaron considerablemente y los niveles de expresión de HSP90 apenas sufrieron cambios (Figura 44, B).

3.3 Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 en proteínas relacionadas con HSP90 a tiempos cortos

A continuación se investigaron los efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90 en ensayos realizados a tiempos cortos (4, 8 y 16 horas). En concreto, se estudiaron los niveles de expresión de los receptores RTK clientes de HSP90, EGFR y HER2, y los niveles de las chaperonas HSP70 y HSP90, en varias líneas celulares de CP. Los experimentos mostraron que la disminución en los niveles de expresión tanto de EGFR como de HER2 comenzaba a percibirse tras 4 y 8 horas de tratamiento (Figura 45).

Tras el tratamiento de 17-AAG (0,5 μ M), la línea sensible a 17-AAG, **IMIM-PC-2**, mostró una disminución de EGFR a las 8 horas de tratamiento y de HER2 a las 16 horas (Figura 45, A). Además, los niveles de HSP70, biomarcador de la inhibición de HSP90, comenzaron a incrementarse tras 4 horas de tratamiento. Por el contrario, los niveles de expresión de EGFR no variaron en la línea resistente a 17-AAG, **PANC-1**, y en los niveles de HER2 se detectó un leve descenso a las 16 horas (Figura 45, A). Los niveles de HSP70 apenas mostraron cambios en esta línea celular.

Tras el tratamiento con NVP-AUY922 (0,1 μ M), las dos líneas celulares analizadas, **IMIM-PC-1** y **CFPAC-1**, que son sensibles a NVP-AUY922, mostraron una disminución de los niveles de expresión de HER2 a las 4 horas de tratamiento y de los niveles de EGFR entre las 8 y las 16 horas (Figura 45, B). Los niveles de expresión de HSP70 se incrementaron a las 4 horas de tratamiento en la línea **IMIM-PC-1**, y a las 8 horas de tratamiento en la línea **CFPAC-1**.

Resultados

Los niveles de HSP90 no se alteraron ni con el tratamiento de 17-AAG, ni con el tratamiento con NVP-AUY922 en ninguna de las líneas celulares analizadas, del mismo modo que no se modificaron después de los tratamientos a tiempos más largos, comentados en los apartados anteriores.

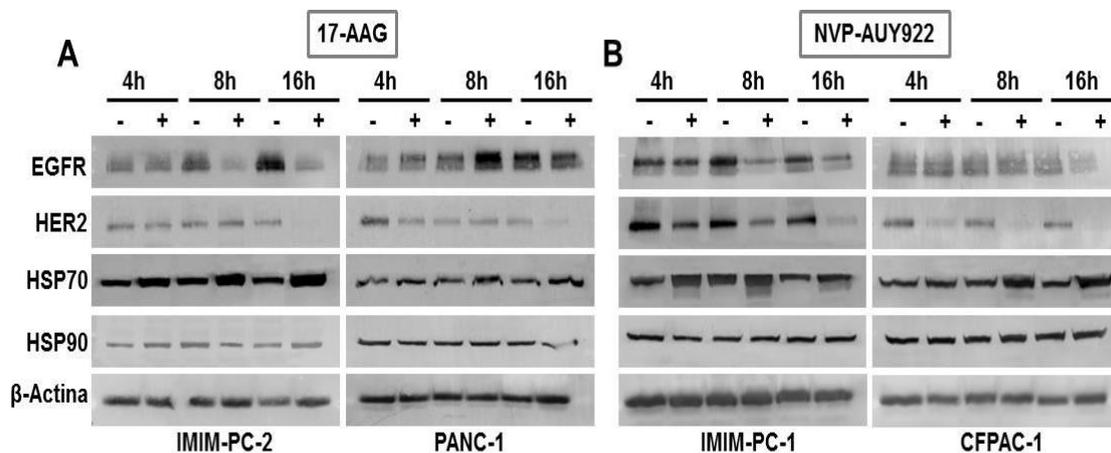


Figura 45: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90 a tiempos cortos. A) Las líneas celulares de CP, IMIM-PC-2 y PANC-1 (A), se cultivaron y trataron con DMSO (-) o con 0,5 μ M de 17-AAG (+) durante 4, 8 o 16 horas. B) Las líneas celulares de CP, IMIM-PC-1 y CFPAC-1 (B), se cultivaron y trataron con DMSO (-) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (+) durante 4, 8 o 16 horas. Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente a las proteínas EGFR, HER2, HSP70 y HSP90. β -actina se utilizó como control de carga para todas las condiciones.

3.4 Efectos en los niveles de fosforilación en diferentes quinasas tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922

Para profundizar en el estado de activación de las rutas PI3-K/Akt y MAPK tras la inhibición de HSP90, con 17-AAG y NVP-AUY922, se decidió utilizar un kit (ver Materiales y Métodos) que permite determinar simultáneamente el estado de fosforilación de varias proteínas implicadas en estas rutas de señalización. El estatus de fosforilación de varias de estas proteínas tras el tratamiento de 17-AAG (0,5 μ M) o de NVP-AUY922 (0,1 μ M) ha sido presentado en la Figura 46.

Entre las proteínas analizadas, varias participan en la ruta PI3-K/Akt. Una de ellas, es la proteína Akt. Concretamente, se analizó el estatus de fosforilación de sus tres isoformas: Ser473 (Akt1), Ser474 (Akt2) y Ser472 (Akt3), y además, de sus niveles de fosforilación total (Akt pan). También se determinó el estatus de fosforilación de la proteína quinasa p70S6K. Esta proteína es sustrato de mTOR, y mTOR puede ser

activada por medio de Akt. Además, se detectaron los niveles de fosforilación de Erk1 (Thr202/ Tyr204), y de Erk2 (Thr185/ Tyr187), última proteína quinasa de la ruta MAPK. Por último, el estatus de fosforilación de la proteína RSK1 también fue analizado y representado. Esta proteína quinasa puede ser activada por Erk 1/2, y también puede regular la activación de mTOR, por lo que es una proteína que puede influir en ambas rutas [258, 259]. Además, ha sido descrita como otra de las proteínas clientes de HSP90.

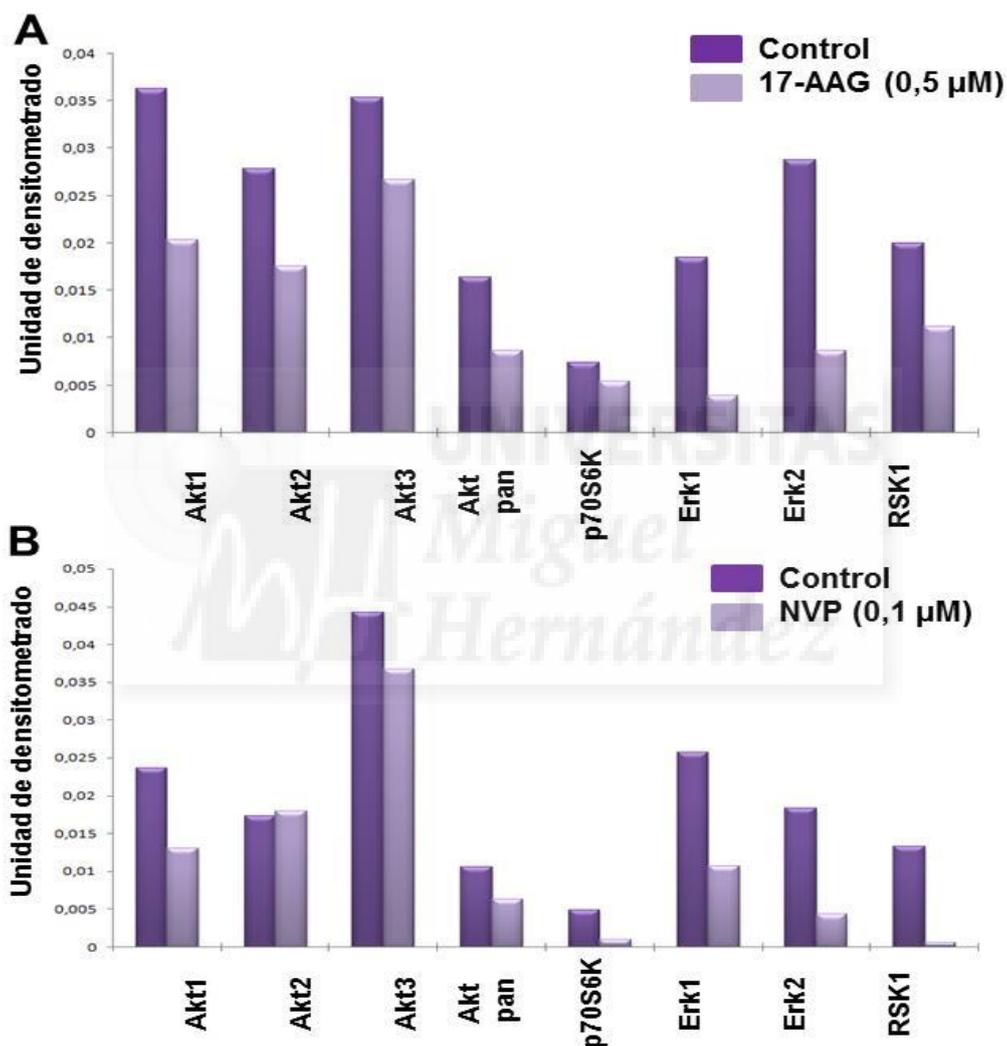


Figura 46: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles relativos de fosforilación de proteínas relacionadas con las rutas PI3-K/Akt y MAPK. A) Las células IMIM-PC-2 se trataron con DMSO (barras control) o con 0,5 μM de 17-AAG (barras 17-AAG) durante 24 horas. B) Las células IMIM-PC-2 se trataron con DMSO (barras control) o con 0,1 μM de NVP-AUY922 (barras NVP-AUY922) durante 24 horas. Los extractos obtenidos se analizaron con el kit Human phospho-MAPK array. El densitometrado de los puntos correspondientes a la fosforilación de dichas quinasas está representado para las condiciones control y tratamiento.

Resultados

Este experimento se realizó en la línea celular de CP **IMIM-PC-2**, por su sensibilidad a ambos inhibidores. Para ello, se dispuso una condición control (células tratadas con DMSO) y una condición de células tratadas con 17-AAG (0,5 μ M) o con NVP-AUY922 (0,1 μ M) durante 24 horas. Los resultados obtenidos tras el revelado de las membranas mostraron que se producía una disminución del estado de fosforilación de las quinasas: Akt1, Akt3, Akt pan, p70S6K, Erk1, Erk2 y RSK1, cuando las células eran tratadas con 17-AAG y NVP-AUY922 (Figura 46, A y B). La isoforma Akt2 solamente disminuyó con el tratamiento de 17-AAG (Figura 46, A), pero los niveles de fosforilación del resto de isoformas y de Akt pan (totales) se redujeron con ambos inhibidores (Figura 46, A y B).

Además de la utilización del kit, también se determinaron los niveles de fosforilación de la proteína RPS6, sustrato de p70S6K y por tanto relacionada con la ruta PI3-K/Akt, mediante Western blot. Este experimento se realizó en tres líneas celulares de CP, **IMIM-PC-2**, **IMIM-PC-1** y **PANC-1**, y dos líneas celulares de CCR, **HT-29** y **Caco-2**, tratadas con 17-AAG o NVP-AUY922 durante 24 horas (Figura 47).

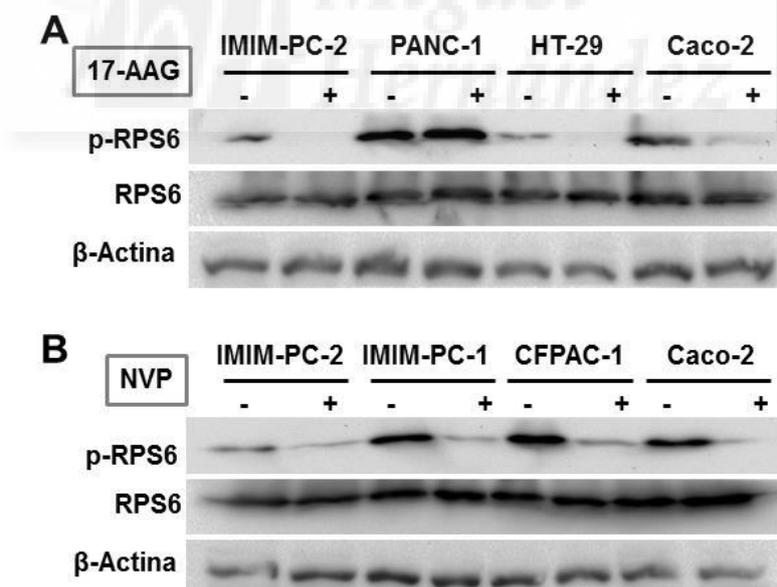


Figura 47: Efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de fosforilación de RPS6. A) Las líneas celulares de CP, IMIM-PC-2 y PANC-1, y las líneas de CCR, HT-29 y Caco-2, se cultivaron y se trataron con DMSO (-) o con 0,5 μ M de 17-AAG (+) durante 24 horas. B) Las líneas celulares de CP, IMIM-PC-2, IMIM-PC-1 y CFPAC-1, y la línea celular de CCR, Caco-2, se cultivaron y trataron con DMSO (-) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (+) durante 24 horas. Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente a p-RPS6 y RPS6 total. β -actina se utilizó como control de carga para todas las condiciones.

Los resultados mostraron que la línea resistente a 17-AAG, **PANC-1**, no presenta disminución de los niveles de fosforilación de RPS6. En la línea de CCR **Caco-2**, también considerada resistente a 17-AAG, se observa una leve disminución. En las líneas sensibles a 17-AAG, **IMIM-PC-2** y **HT-29**, los niveles de fosforilación de RPS6 disminuyeron hasta su total desaparición (Figura 47, A). Por otro lado, si observamos lo ocurrido tras el tratamiento con NVP-AUY922, todas las líneas analizadas, **IMIM-PC-2**, **IMIM-PC-1**, **CFPAC-1** y **Caco-2**, que son sensibles a este inhibidor, mostraron una reducción de la fosforilación de RPS6 (Figura 47, B).

3.5 Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre proteínas relacionadas con HSP90 en cultivos primarios

Siguiendo con el estudio de los cambios que se producen en los niveles de expresión de las proteínas relacionadas HSP90 cuando las células son tratadas con inhibidores de HSP90, también se quiso investigar cómo afectaban dichos tratamientos a los niveles de expresión de proteínas en los cultivos primarios obtenidos de muestras tumorales de pacientes con CCR. Para ello, los cultivos primarios fueron tratados durante 24 horas con una concentración baja y una concentración alta de cada inhibidor; y a continuación se estudiaron los niveles de expresión de EGFR, como proteína cliente de HSP90 y activador de las rutas PI3-K/Akt y MAPK, el estado de fosforilación de Erk 1/2 como indicador de la inhibición de la ruta MAPK, y la chaperona HSP70, como biomarcador de respuesta a la inhibición de HSP90. De manera complementaria, se estudiaron los niveles de HSP90, como se hizo en los experimentos realizados con líneas celulares. Por desgracia, el crecimiento de los cultivos primarios es mucho más lento y la obtención de extractos celulares fue mucho más difícil que en las líneas celulares establecidas, por lo que el número de proteínas analizadas fue menor que en las líneas celulares. Los resultados mostraron que los niveles de EGFR disminuyeron en tres cultivos primarios (**HCUVA-CC-3^{CT}**, **HCUVA-CC-1^{CT}** y **HCUVA-CC-34**) tras el tratamiento con los dos inhibidores. La única excepción fue el cultivo **HCUVA-CC-34** tratado con una concentración baja de NVP-AUY922 (0,1 μ M), donde los niveles de EGFR no variaron (Figura 48). Los niveles de EGFR no pudieron ser valorados en el cultivo **HCUVA-CC-1**, ya que no se detectaron niveles de expresión de este receptor en este cultivo. Por otro lado, los niveles de fosforilación de Erk 1/2 también disminuyeron

Resultados

tras el tratamiento de 17-AAG en los cuatro cultivos. Sin embargo, no ocurrió lo mismo tras la exposición con NVP-AUY922, que no fue capaz de disminuir considerablemente la fosforilación de Erk 1/2 en los cultivos **HCUVA-CC-34**, con ambas concentraciones, ni en **HCUVA-CC-3^{CT}**, con una concentración baja (0,1 μ M) (Figura 48). Es interesante comentar que el cultivo **HCUVA-CC-3^{CT}**, a esta misma concentración de NVP-AUY922 (0,1 μ M) en otro tipo de ensayos mostró una alta sensibilidad a NVP-AUY922, por lo que es posible que otras proteínas no estudiadas estén afectadas tras el tratamiento. En el caso del cultivo **HCUVA-CC-34**, los niveles de expresión de las proteínas analizadas disminuyeron, sobre todo tras el tratamiento con 17-AAG, a pesar de su baja respuesta al tratamiento con 17-AAG o NVP-AUY922 en los ensayos de proliferación. Por otro lado, los niveles de la chaperona HSP70 se incrementaron en los cuatro cultivos tratados con ambos inhibidores, a excepción del cultivo **HCUVA-CC-34** cuando fue tratado con una concentración baja de NVP-AUY922, indicando el leve efecto de este inhibidor sobre este cultivo a esa concentración. Por último, los niveles de expresión de HSP90 sufrieron leves modificaciones en algunos cultivos, aunque es posible que estén relacionadas con pequeñas variaciones en la carga.

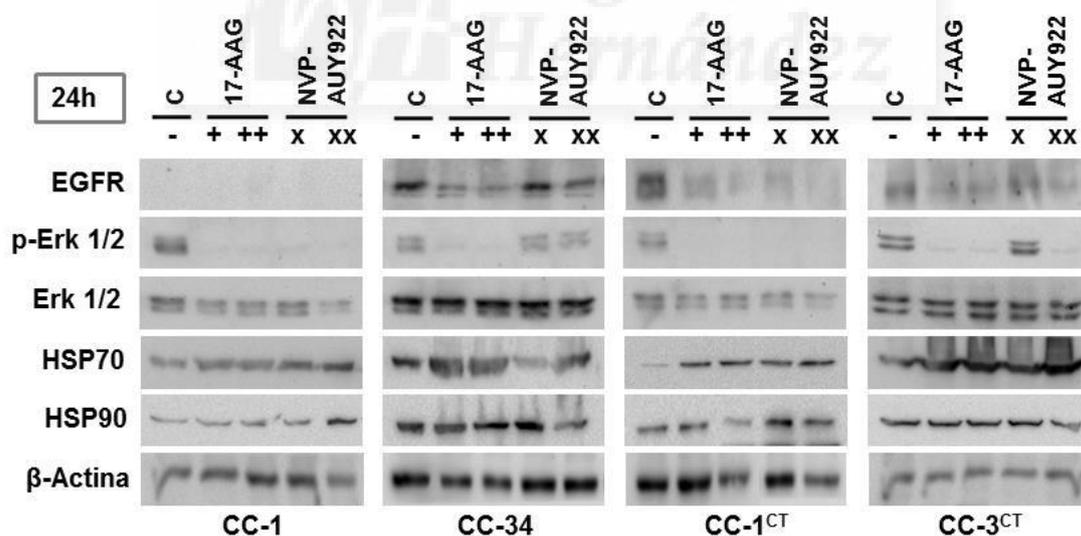


Figura 48: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con HSP90 en cultivos primarios. Los cultivos primarios HCUVA-CC-1 (CC-1), HCUVA-CC-34 (CC-34), HCUVA-CC-1^{CT} (CC-1^{CT}) y HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT}) se cultivaron y trataron con DMSO (-), o con 0,5 μ M (+) o 2 μ M (++) de 17-AAG, o con 0,1 μ M (x) o 1 μ M (xx) de NVP-AUY922, durante 24 horas. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante Western blot usando anticuerpos frente a EGFR, p-Erk 1/2, Erk 1/2, Hsp70 y HSP90. β -actina fue utilizada como control de carga para todas las condiciones.

4. Efecto de los inhibidores de HSP90 sobre la distribución de las fases del ciclo celular

Dado que la proliferación celular se produce mediante la progresión de las células a lo largo de las distintas fases del ciclo celular, se realizaron diferentes experimentos para estudiar y evaluar el efecto del tratamiento con los inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922, en el ciclo celular de las líneas celulares de CP y de CCR, y de los cultivos primarios derivados de tumores de pacientes con CCR.

4.1 Efectos de 17-AAG sobre el ciclo celular en líneas celulares

El inhibidor 17-AAG presentó un efecto antiproliferativo en la mayoría de las líneas celulares estudiadas de CP y de CCR, a excepción de algunas líneas (**CFPAC-1**, **PANC-1**, **Caco-2**), que se muestran resistentes al tratamiento con 17-AAG, como se comentó en el apartado 2.1.1. Para estudiar los cambios que se producen en la distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular tras el tratamiento con 17-AAG, se seleccionaron tanto líneas celulares sensibles como algunas resistentes a 17-AAG, con el fin de profundizar en el mecanismo antiproliferativo de este fármaco. De hecho, los resultados revelaron que 17-AAG no ejercía el mismo efecto en todas las líneas celulares, al igual que ocurría en los ensayos de proliferación.

4.1.1 Efectos de 17-AAG sobre el ciclo celular en líneas celulares de CP

A continuación, se describen los efectos producidos por 17-AAG (0,5 μ M) en cuatro líneas celulares de CP: dos líneas celulares sensibles a 17-AAG ($IC_{50} < 1 \mu$ M), **IMIM-PC-2** e **IMIM-PC-1**, y dos líneas resistentes ($IC_{50} > 1 \mu$ M), **PANC-1** y **CFPAC-1**. Los datos de los experimentos se han recogido en la tabla 22.

Unas de las líneas celulares de CP que más distan en cuanto a la sensibilidad a 17-AAG en los ensayos de proliferación son **IMIM-PC-2** y **PANC-1**, representando una de las líneas más sensibles a 17-AAG y una de las más resistentes, respectivamente. En la distribución de las fases del ciclo celular, también se comprobó que se comportan de forma diferente tras la exposición con 17-AAG (0,5 μ M). Si se analizan los efectos de 17-AAG sobre la línea celular **IMIM-PC-2**, a las 24 horas de tratamiento se observa una acumulación en la fase G_1 , con la consecuente reducción de la fase S, que también se produjo a las 48 y 72 horas de tratamiento. La acumulación en la fase G_1 y la

Resultados

disminución en la fase S indican que las células no podían superar el "checkpoint" de G_1 , y no estaban entrando en la fase S. También se observa un incremento de la fase $SubG_1$ a partir de las 24 horas, muy significativo a las 72 horas de tratamiento, donde llega a representar más de un 40% de todas las células con respecto al control (Tabla 22). A medida que aumenta la fase $SubG_1$, también se observa un decrecimiento de la fase G_1 , probablemente debido a que las células eran incapaces de continuar el ciclo y acababan muriendo (Figura 49, A).

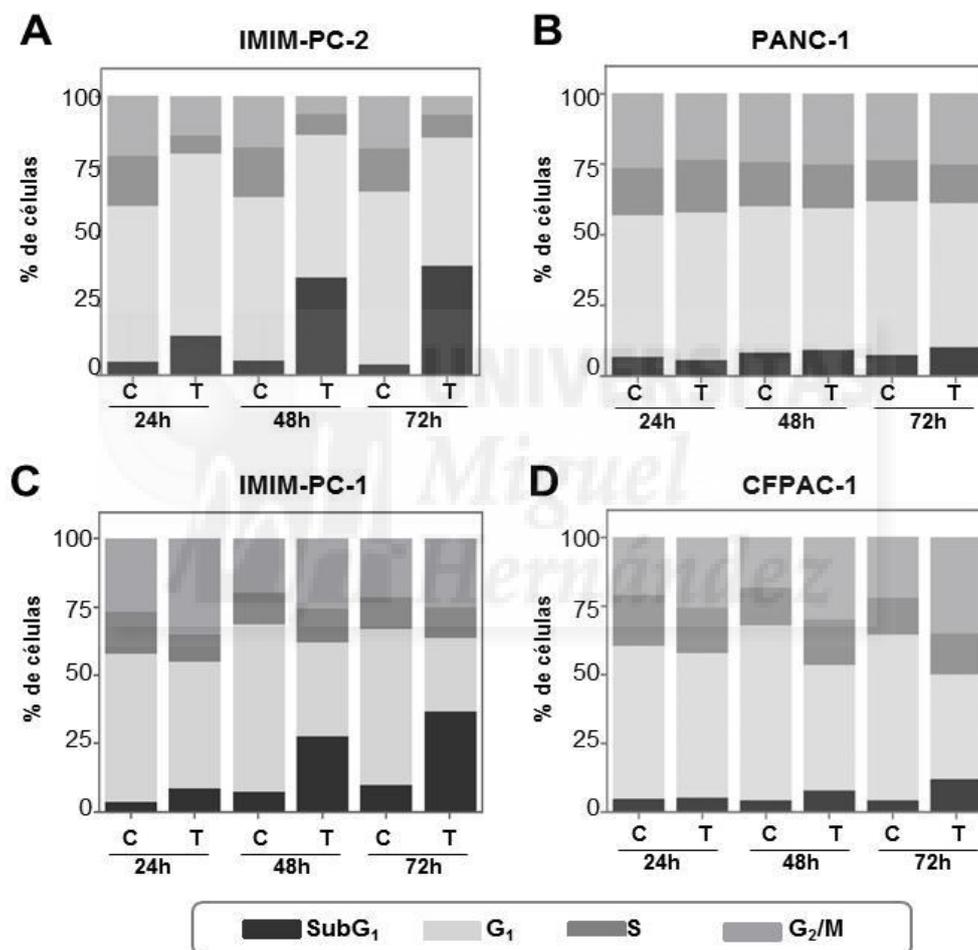


Figura 49: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CP. Las líneas A) IMIM-PC-2, B) PANC-1, C) IMIM-PC-1 y D) CFPAC-1 se cultivaron y trataron con DMSO (C) o con 0,5 μ M de 17-AAG (T) durante 24h, 48h o 72h. El contenido en ADN fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo ($n \geq 3$).

Además, se analizó el efecto del inhibidor 17-AAG sobre la ciclina D1 mediante Western blot, dado que la ciclina D1 media en el avance de las células de la fase G_1 a la fase S del ciclo, y se comprobó que 17-AAG provocaba un descenso en los niveles de expresión de esta ciclina en la línea **IMIM-PC-2** (Figura 50). Por el contrario, en la línea

celular **PANC-1** los valores entre las células control y las células tratadas apenas sufrieron variación, y 17-AAG (0,5 μ M) tampoco produjo ningún efecto apreciable sobre su ciclo celular (Figura 49, B, Tabla 22).

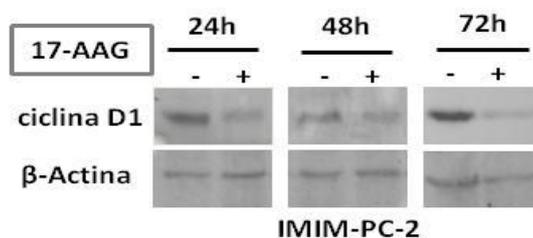


Figura 50: Efecto de 17-AAG sobre los niveles de ciclina D1 en la línea celular de CP IMIM-PC-2. Las células se cultivaron y trataron con DMSO (-) o con 0,5 μ M de 17-AAG (+) durante 24h, 48h o 72h. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante Western blot usando anticuerpos frente a ciclina D1. β -actina fue utilizada como control de carga.

En la línea celular de CP sensible a 17-AAG **IMIM-PC-1** se observa un aumento de la fase G_2/M tras el tratamiento con el inhibidor durante 24 horas, y al mismo tiempo un incremento de fase $SubG_1$, que se hizo más pronunciado a las 48 y 72 horas, llegando a aumentar hasta un 26,7% con respecto a las células no tratadas (Figura 49, C, Tabla 22). El incremento de la fase $SubG_1$ está acompañado por una disminución de la fase G_1 , mientras que la fase S se mantiene en valores similares. Por tanto, en las líneas celulares de CP sensibles a 17-AAG, **IMIM-PC-2** e **IMIM-PC-1**, se produce un "bloqueo" del avance de las células a lo largo del ciclo celular, pero en distintas fases del ciclo celular. Además, ambas líneas celulares incrementaron la fase $SubG_1$, lo que indicaba que se estaba produciendo fragmentación de ADN, una característica del proceso de muerte celular.

También se estudiaron los efectos de 17-AAG en la línea celular resistente **CFPAC-1** (Figura 49, D). Tras el tratamiento con 17-AAG se produce una acumulación gradual de las células en la fase G_2/M del ciclo celular, que llega hasta un incremento del 15% entre las células no tratadas y las tratadas tras 72 horas de tratamiento (Tabla 22). A consecuencia de esta acumulación, la fase G_1 del ciclo celular disminuye, mientras que la fase S se mantiene en valores semejantes entre células tratadas y no tratadas, lo que indica que la síntesis de ADN no se ve afectada. Además, a las 72 horas

Resultados

de tratamiento se aprecia un ligero aumento de la fase SubG₁, mucho menor que el observado en las líneas sensibles.

IMIM-PC-2	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	4,8 ± 1,1	14,1 ± 3,7	5,2 ± 1,4	33,2 ± 5,8	3,7 ± 0,4	40,9 ± 7,8
G ₁	55,7 ± 1,4	65,2 ± 3,9	58,6 ± 2,4	48,5 ± 3,7	59,7 ± 2,4	48,0 ± 6,1
S	17,9 ± 2,4	6,5 ± 2,0	17,7 ± 2,4	7,0 ± 1,6	14,8 ± 1,6	8,6 ± 2,4
G ₂ /M	21,6 ± 3,0	14,2 ± 0,9	18,5 ± 3,1	6,2 ± 1,7	18,3 ± 2,9	7,0 ± 1,1
PANC-1	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	6,1 ± 0,1	5,1 ± 1,5	7,6 ± 1,4	8,5 ± 1,2	7,5 ± 1,5	10,5 ± 0,9
G ₁	46,9 ± 1,5	47,6 ± 2,1	48,2 ± 1,2	46,8 ± 2,9	56,3 ± 1,2	53,9 ± 1,6
S	15,7 ± 0,9	17,0 ± 3,0	14,5 ± 1,4	14,5 ± 2,8	14,9 ± 3,5	14,4 ± 3,5
G ₂ /M	24,9 ± 4,4	21,6 ± 2,7	22,9 ± 3,9	23,5 ± 2,9	24,5 ± 1,1	26,8 ± 0,4
IMIM-PC-1	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	3,9 ± 0,9	8,6 ± 1,2	7,6 ± 2,5	30,6 ± 2,8	10,6 ± 1,1	37,1 ± 3,6
G ₁	53,0 ± 3,1	44,3 ± 2,9	61,4 ± 4,3	37,4 ± 6,1	58,7 ± 1,7	27,0 ± 4,2
S	15,0 ± 2,5	9,4 ± 4,7	11,5 ± 0,9	13,4 ± 4,3	11,9 ± 2,4	11,3 ± 2,8
G ₂ /M	25,7 ± 3,4	32,9 ± 5,2	19,6 ± 2,8	27,5 ± 4,2	21,4 ± 3,4	24,9 ± 4,9
CFPAC-1	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	4,6 ± 1,2	4,8 ± 0,8	3,9 ± 0,7	6,5 ± 0,9	3,9 ± 1,1	10,8 ± 2,8
G ₁	56,3 ± 4,3	49,4 ± 3,3	61,1 ± 3,0	38,6 ± 6,2	58,5 ± 3,8	34,8 ± 8,9
S	18,7 ± 4,8	15,5 ± 5,5	13,3 ± 2,8	14,0 ± 3,9	12,9 ± 1,6	13,5 ± 1,6
G ₂ /M	21,4 ± 2,2	24,1 ± 3,4	17,7 ± 1,5	25,4 ± 7,8	21,6 ± 3,8	32,1 ± 9,9

Tabla 22: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas celulares de CP tratadas con DMSO (control) y tratadas con 0,5 µM de 17-AAG durante 24, 48 o 72h.

4.1.2 Efectos de 17-AAG sobre el ciclo celular en las líneas celulares de CCR

Del mismo modo, se evaluó el efecto de 17-AAG sobre cuatro líneas de CCR: dos líneas celulares sensibles, HT-29 y SW620, una línea con sensibilidad intermedia, LoVo, y una línea resistente, Caco-2. Los datos de los experimentos se han recogido en la tabla 23.

La línea celular **HT-29**, una de las líneas más sensible al efecto antiproliferativo de 17-AAG, experimenta una acumulación de las células en la fase G_2/M , poco evidente a las 24 horas de tratamiento, pero muy significativa tanto a 48 como 72 horas (Figura 51, A). Además, la fase $SubG_1$ también aumenta considerablemente a 48 y 72 horas de tratamiento, mientras que las fases G_1 y S disminuyen a consecuencia del aumento de las otras fases. Algo similar ocurre en la línea **SW620** (Figura 51, C), donde no se aprecian grandes cambios tras 24 horas de tratamiento, pero posteriormente se produce un incremento en fase G_2/M , y sobre todo de la fase $SubG_1$, que a 72 horas presenta un aumento del 30% con respecto las células no tratadas (Tabla 23). También se detecta una reducción del resto de las fases a 24, 48 y 72 horas.

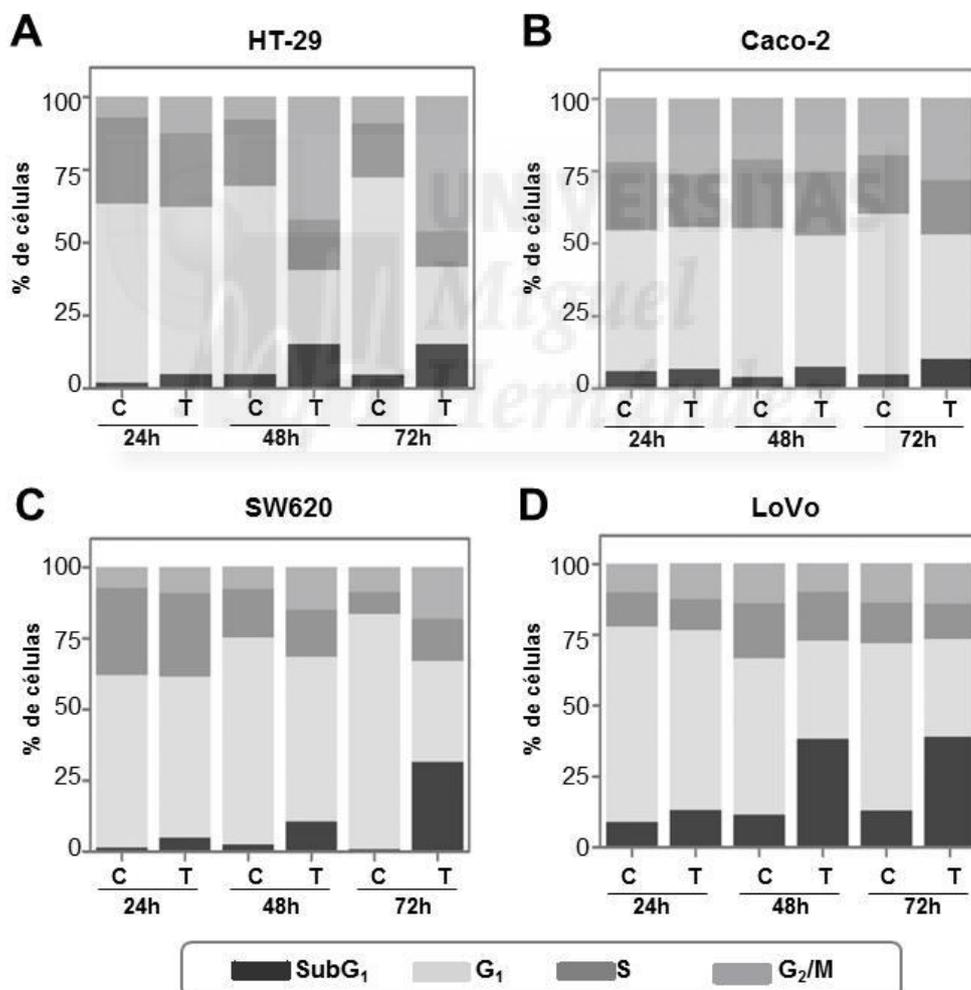


Figura 51: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CCR. Las líneas A) HT-29, B) Caco-2, C) SW620 y D) LoVo se cultivaron y trataron con DMSO (C) o con 0,5 μ M de 17-AAG (T) durante 24h, 48h o 72h. El contenido en ADN fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo ($n \geq 3$).

Resultados

En la línea celular **Caco-2** se aprecia un ligero incremento de la fase G₂/M tras 24 y 48 horas de tratamiento, que continuó a las 72 horas, y al cual se suma un leve aumento de la fase SubG₁ (Figura 51, B). Sin embargo, el efecto antiproliferativo de 17-AAG es bastante modesto en esta línea. El caso de la línea **LoVo** es más singular (Figura 51, D), ya que el tratamiento durante 72 horas con 17-AAG provoca un incremento de la fase SubG₁ del 26,7% (Tabla 23), indicativo de que las células experimentaban muerte celular, sin una acumulación importante previa en ninguna fase del ciclo. Estos datos apuntan que, efectivamente, el inhibidor 17-AAG tiene un efecto citotóxico sobre esta línea celular. En general, el incremento de la fase SubG₁ se produce en las tres líneas sensibles o de sensibilidad intermedia a 17-AAG (**HT-29**, **SW620** y **LoVo**), mientras que en la línea resistente **Caco-2** apenas aumenta.

HT-29	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	1,8 ± 1,0	4,1 ± 1,1	4,6 ± 2,7	14,4 ± 1,2	4,2 ± 2,0	14,9 ± 2,9
G ₁	61,3 ± 3,1	51,0 ± 0,5	63,4 ± 4,5	24,5 ± 0,9	64,9 ± 3,7	26,5 ± 2,3
S	29,6 ± 5,9	22,5 ± 10,0	22,4 ± 4,9	16,7 ± 3,4	17,9 ± 0,3	12,2 ± 1,8
G ₂ /M	7,3 ± 1,8	11,3 ± 0,9	7,7 ± 1,9	41,0 ± 3,2	8,9 ± 1,2	46,5 ± 2,6
Caco-2	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	5,8 ± 1,0	6,5 ± 1,1	3,8 ± 0,6	7,2 ± 2,3	4,7 ± 0,9	10,0 ± 2,0
G ₁	48,3 ± 0,8	48,9 ± 1,1	51,2 ± 2,3	45,1 ± 2,6	55,2 ± 2,5	42,9 ± 3,3
S	23,5 ± 3,7	18,2 ± 3,9	23,7 ± 4,2	22,0 ± 4,8	20,0 ± 2,9	18,7 ± 3,0
G ₂ /M	22,1 ± 3,6	26,3 ± 3,9	21,2 ± 2,8	25,3 ± 3,2	19,8 ± 1,7	28,4 ± 2,6
SW620	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	1,1 ± 0,8	4,6 ± 0,9	2,2 ± 1,6	10,3 ± 2,4	0,6 ± 0,9	31,4 ± 2,9
G ₁	60,7 ± 1,2	56,8 ± 1,7	72,9 ± 9,6	57,9 ± 5,0	82,8 ± 2,5	35,4 ± 1,1
S	30,7 ± 0,5	29,3 ± 5,2	17,1 ± 11,1	16,6 ± 0,2	7,7 ± 1,7	14,9 ± 7,2
G ₂ /M	7,5 ± 2,3	9,3 ± 1,5	7,9 ± 5,4	15,2 ± 2,4	8,9 ± 1,8	18,3 ± 4,9
LoVo	24h		48h		72h	
	control	17-AAG	control	17-AAG	control	17-AAG
SubG ₁	7,7 ± 3,2	12,9 ± 1,2	11,1 ± 0,7	36,6 ± 3,1	10,9 ± 0,9	37,6 ± 6,9
G ₁	60,8 ± 5,6	62,9 ± 3,5	54,5 ± 0,7	33,5 ± 3,8	54,3 ± 4,3	33,6 ± 6,3
S	10,8 ± 0,7	10,9 ± 2,7	18,9 ± 1,1	16,7 ± 1,4	13,3 ± 2,2	12,1 ± 1,4
G ₂ /M	8,9 ± 4,3	12,6 ± 1,7	13,9 ± 0,4	9,6 ± 0,7	12,8 ± 3,9	13,9 ± 2,6

Tabla 23: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas celulares de CCR tratadas con DMSO (control) o 0,5 μM de 17-AAG durante 24, 48 o 72h.

4.2 Efectos de NVP-AUY922 sobre el ciclo celular en líneas celulares

Una vez estudiado el efecto de NVP-AUY922 en los ensayos de proliferación, que indican que este fármaco es capaz de inhibir el crecimiento de todas las líneas celulares de CP y de CCR analizadas, también se investigaron los efectos de este inhibidor sobre la distribución del contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular, en algunas de las líneas celulares. En concreto, se escogieron las mismas líneas celulares estudiadas con 17-AAG, y los datos de los experimentos se han recogido en la tabla 24 para las líneas celulares de CP y en la tabla 25 para las líneas celulares de CCR.

4.2.1 Efectos de NVP-AUY922 sobre el ciclo celular en las líneas celulares de CP

El tratamiento con NVP-AUY922 produce una acumulación de células en la fase G_2/M del ciclo en las líneas celulares **PANC-1** y **CFPAC-1** (Figura 52, B y D), con un incremento del 18,6% y 24,9% (Tabla 24), respectivamente, tras 24 horas de tratamiento, y que se mantiene a 48 y 72 horas. También se observa un incremento de la fase $SubG_1$ en ambas líneas, que a las 24 horas de tratamiento era leve, y fue aumentando considerablemente con un mayor tiempo de exposición a NVP-AUY922. A 72 horas de tratamiento, el incremento de la fase $SubG_1$ es de 26,8% para la línea **PANC-1**, y de 21,9% para la línea **CFPAC-1** (Tabla 24). Además, en ambas líneas celulares se observa un descenso considerable en la fase G_1 , y en la fase S, que disminuye levemente.

En la línea celular **IMIM-PC-1**, se observa una leve acumulación en la fase G_2/M a 24, 48 y 72 horas de tratamiento (Figura 52, C), y un incremento de la fase $SubG_1$, que llega a representar un aumento del 30,4% con respecto a las células no tratadas a 72 horas (Tabla 24). La fase G_1 también disminuye, sobre todo a 48 y 72 horas de tratamiento, y la fase S apenas experimenta cambios.

Por último, la línea celular **IMIM-PC-2** presenta una acumulación muy leve en la fase G_2/M , y una disminución de las fases G_1 y S, también bastante leve (Figura 52, A), tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento. El cambio más significativo que experimenta esta línea es un incremento de la fase $SubG_1$ en las células tratadas, que fue de un 14,7% tras 72 horas de tratamiento con NVP-AUY922 (Tabla 24). En general, las cuatro líneas

Resultados

celulares de CP cuando fueron tratadas experimentaron un incremento considerable de la fase SubG₁, lo que indica que en todas se produce fragmentación de ADN, y además, en dos de ellas (PANC-1 y CFPAC-1) tiene lugar un importante "bloqueo" en la fase G₂/M del ciclo celular.

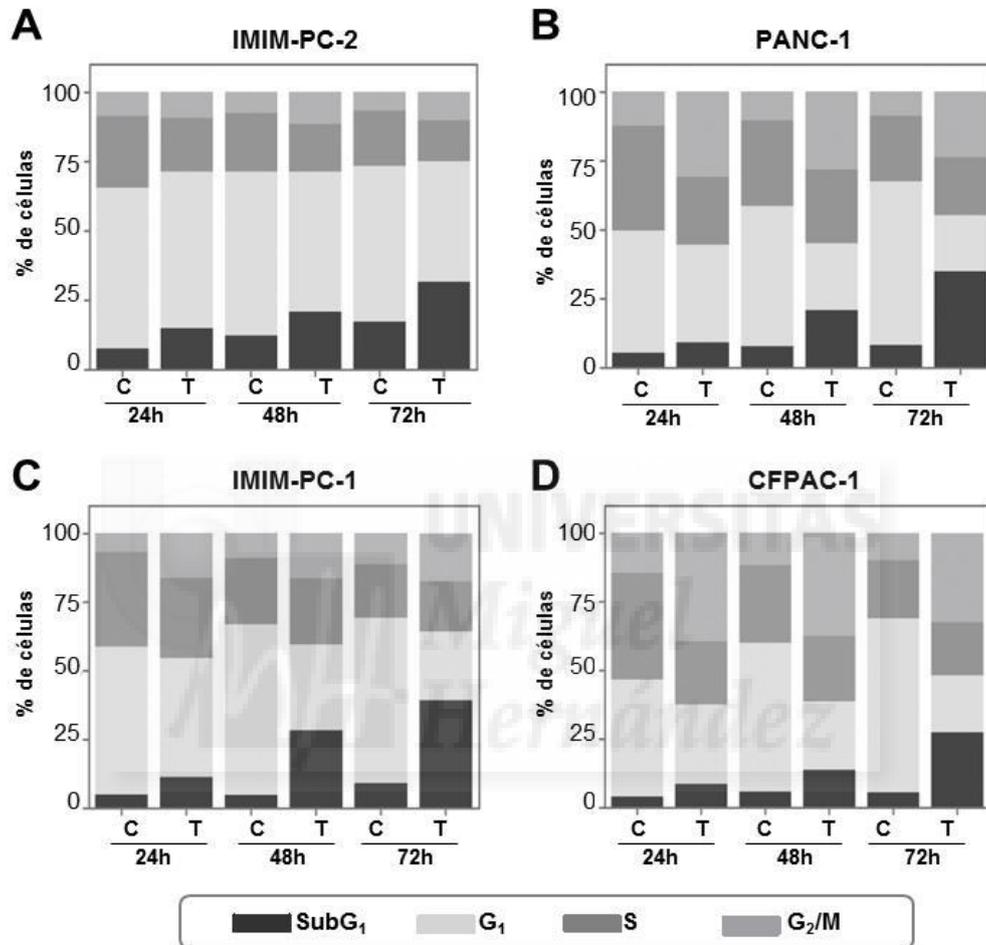


Figura 52: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CP. Las líneas A) IMIM-PC-2, B) PANC-1, C) IMIM-PC-1 y D) CFPAC-1 se cultivaron y trataron con DMSO (C) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (T) durante 24h, 48h o 72h. El contenido en ADN fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo (n \geq 3).

IMIM-PC-2	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	7,4 ± 1,9	14,9 ± 1,8	11,9 ± 0,7	20,9 ± 3,8	16,9 ± 4,3	31,6 ± 7,7
G ₁	57,5 ± 1,4	56,4 ± 3,4	57,7 ± 1,5	50,4 ± 3,4	54,9 ± 1,9	43,4 ± 2,9
S	25,7 ± 2,6	19,3 ± 2,7	20,6 ± 2,3	17,2 ± 1,4	19,5 ± 0,9	14,8 ± 3,4
G ₂ /M	8,5 ± 0,9	9,5 ± 2,1	7,5 ± 1,0	11,6 ± 1,9	6,6 ± 1,6	10,3 ± 2,5
PANC-1	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	5,3 ± 0,9	9,1 ± 1,5	7,7 ± 0,8	20,8 ± 3,5	8,1 ± 1,7	34,9 ± 4,8
G ₁	44,4 ± 3,2	35,4 ± 7,7	50,8 ± 1,6	24,2 ± 2,2	59,4 ± 1,3	20,4 ± 0,9
S	38,0 ± 3,2	24,6 ± 5,0	31,2 ± 0,9	26,8 ± 1,3	23,8 ± 1,4	20,9 ± 1,6
G ₂ /M	12,3 ± 1,3	30,9 ± 8,9	10,4 ± 1,4	28,2 ± 3,4	8,8 ± 0,6	23,8 ± 4,4
IMIM-PC-1	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	4,5 ± 1,6	11,8 ± 1,8	4,8 ± 1,4	28,6 ± 4,3	8,8 ± 1,5	39,2 ± 4,1
G ₁	49,8 ± 2,6	45,6 ± 5,3	62,1 ± 1,3	31,7 ± 6,7	59,4 ± 1,3	25,0 ± 6,2
S	31,8 ± 3,7	30,7 ± 4,3	23,9 ± 2,5	24,4 ± 6,5	19,3 ± 1,1	18,3 ± 2,0
G ₂ /M	6,4 ± 1,4	17,2 ± 2,2	9,2 ± 2,3	16,7 ± 2,9	11,1 ± 0,9	17,4 ± 0,7
CFPAC-1	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	3,9 ± 1,5	8,6 ± 0,3	5,8 ± 1,9	13,7 ± 5,2	5,4 ± 1,6	27,3 ± 5,9
G ₁	42,7 ± 1,2	28,9 ± 4,4	54,2 ± 3,8	25,0 ± 4,8	63,5 ± 4,4	20,8 ± 3,0
S	38,8 ± 0,8	23,0 ± 4,4	28,2 ± 2,3	23,7 ± 3,4	21,4 ± 3,4	19,4 ± 3,2
G ₂ /M	14,6 ± 1,9	39,5 ± 0,4	11,8 ± 0,5	37,5 ± 4,8	9,8 ± 1,9	32,4 ± 3,8

Tabla 24: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos ($n \geq 3$), realizados en cuatro líneas celulares de CP tratadas con DMSO (control) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (NVP) durante 24, 48 o 72h.

4.2.2 Efectos de NVP-AUY922 sobre el ciclo celular en las líneas celulares de CCR

Cuando se analizó el efecto de NVP-AUY922 sobre la distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en cuatro líneas celulares de CCR se determinó que, en general, el fármaco era capaz de producir una acumulación de las células **HT-29**, **SW620** y **Caco-2** en la fase G₂/M (Figura 53, A, B y C). El incremento de la fase G₂/M en las líneas **HT-29** y **SW620** es leve, representando un 6,9% y un 18,6%, respectivamente, tras 72 horas de tratamiento (Tabla 25). Sin embargo, en la línea **Caco-2**, la acumulación

Resultados

en la fase G_2/M es bastante considerable, con un 28,2 % a las 24 horas de tratamiento (Tabla 25), que se mantiene tras 48 y 72 horas de tratamiento. En las tres líneas, sobre todo en la línea celular **Caco-2**, esta acumulación está acompañada de una disminución en las fases G_1 y S.

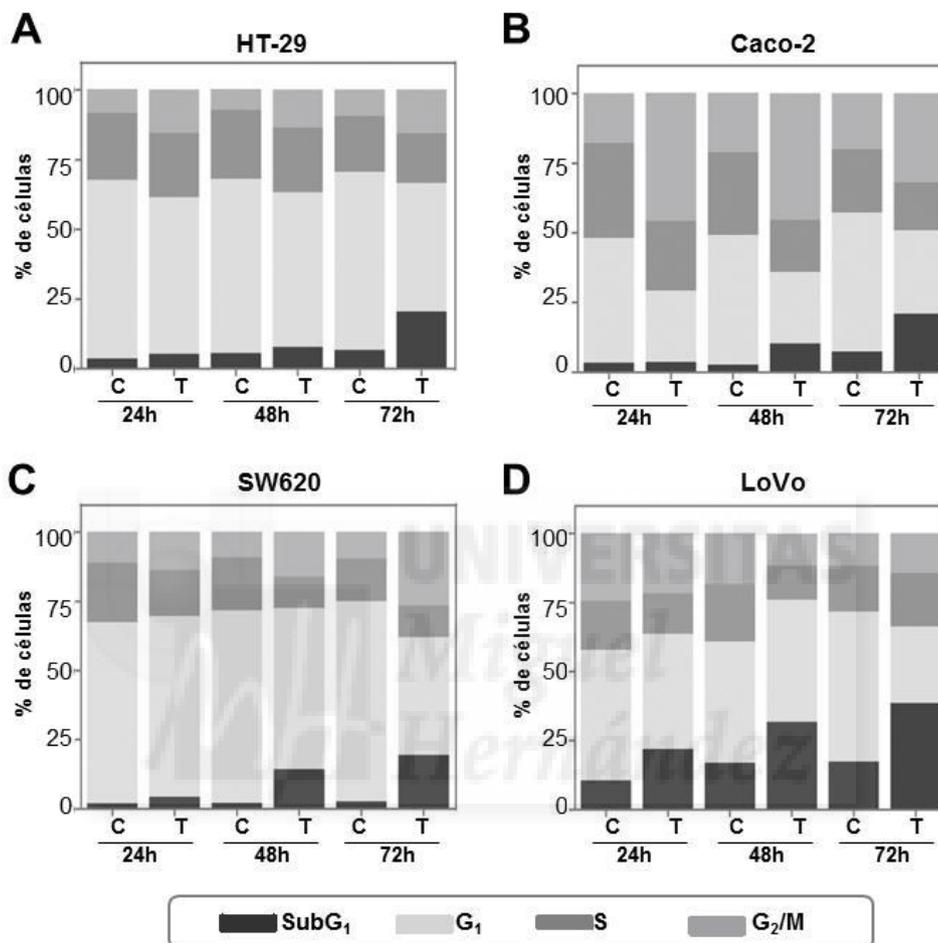


Figura 53: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en líneas celulares de CCR. Las líneas A) HT-29, B) Caco-2, C) SW620 y D) LoVo se cultivaron y trataron con DMSO (C) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (T) durante 24h, 48h o 72h. El contenido en ADN fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo (n \geq 3).

Además, también se produce un incremento paulatino de la fase SubG₁ en las tres líneas de CCR, que llega a suponer un incremento de 14,5% en **HT-29**, un 18% en **SW620** y un 13,6% en **Caco-2**, con respecto a las células no tratadas tras 72 horas con NVP-AUY922 (Tabla 25). En el caso de la línea **LoVo** (Figura 53, D), del mismo modo que pasaba cuando fueron tratadas con 17-AAG, no se detectan casi cambios en las fases del ciclo, a excepción de un incremento de la fase SubG₁, que es de un 13,7% a las 24 horas de tratamiento, y que alcanzó un 19,4% a las 72 horas (Tabla 25). Tras 48 horas

de tratamiento, también se produce una disminución de las fases S y G₂/M en esta línea celular, que continua hasta las 72 horas de tratamiento, y a la que se suma una disminución de la fase G₁, a consecuencia del aumento de células en la fase SubG₁.

HT-29	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	3,3 ± 0,9	5,2 ± 0,8	5,4 ± 0,7	7,7 ± 0,6	6,2 ± 1,1	20,7 ± 3,4
G ₁	60,2 ± 2,8	55,9 ± 1,1	61,6 ± 1,2	55,6 ± 1,5	61,5 ± 3,4	46,9 ± 2,1
S	22,5 ± 2,5	23,0 ± 1,9	24,3 ± 3,8	23,2 ± 1,7	19,2 ± 2,7	17,9 ± 2,8
G ₂ /M	7,9 ± 2,8	15,6 ± 1,9	7,3 ± 2,3	13,7 ± 1,7	9,2 ± 1,8	16,1 ± 1,5
Caco-2	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	3,2 ± 0,6	3,5 ± 0,7	2,5 ± 0,7	10,1 ± 1,4	7,2 ± 5,3	20,8 ± 2,5
G ₁	44,8 ± 3,7	25,7 ± 12,5	46,6 ± 3,1	25,7 ± 8,1	50,0 ± 4,8	29,9 ± 0,6
S	34,1 ± 4,8	24,8 ± 1,7	29,7 ± 5,0	18,7 ± 5,7	22,7 ± 3,4	17,2 ± 2,7
G ₂ /M	17,9 ± 9,2	46,1 ± 11,5	21,3 ± 7,4	45,5 ± 2,4	20,1 ± 2,9	32,1 ± 0,4
SW620	24h		48h		72h	
	control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	1,8 ± 0,9	4,1 ± 1,1	2,0 ± 0,8	13,8 ± 3,1	2,6 ± 0,8	20,6 ± 5,1
G ₁	65,4 ± 3,4	62,7 ± 3,9	69,6 ± 3,4	56,9 ± 3,4	72,2 ± 4,7	45,2 ± 1,8
S	21,5 ± 0,8	16,0 ± 1,9	18,9 ± 2,6	11,3 ± 2,8	15,3 ± 3,9	12,1 ± 0,9
G ₂ /M	11,3 ± 2,4	13,4 ± 5,1	9,4 ± 3,3	15,8 ± 6,8	9,8 ± 1,8	28,4 ± 3,9
LoVo	24h		48h		72h	
	Control	NVP	control	NVP	control	NVP
SubG ₁	9,9 ± 0,7	23,6 ± 2,7	15,6 ± 2,4	31,9 ± 3,5	15,0 ± 6,5	34,4 ± 1,9
G ₁	44,9 ± 1,6	45,0 ± 1,5	40,6 ± 5,5	44,7 ± 2,1	47,4 ± 4,5	24,8 ± 12,0
S	16,9 ± 6,8	15,9 ± 3,8	19,2 ± 0,7	12,5 ± 2,2	14,5 ± 3,4	17,4 ± 4,5
G ₂ /M	23,2 ± 1,9	23,4 ± 5,4	17,2 ± 2,7	11,8 ± 1,2	10,3 ± 5,2	12,9 ± 3,1

Tabla 25: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en cuatro líneas de CCR tratadas con DMSO (control) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (NVP) durante 24, 48 o 72h.

En resumen, se observa un incremento de la fase SubG₁ en las cuatro líneas celulares de CCR tras el tratamiento con NVP-AUY922, al igual que ocurrió en las líneas celulares de CP, y en las líneas HT-29, SW620 y especialmente en la línea Caco-2, un "bloqueo" de las células en la fase G₂/M del ciclo celular.

4.3 Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre el ciclo celular en cultivos primarios

El estudio de la distribución del contenido de ADN en el ciclo celular en los cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes con CCR, para

Resultados

investigar cómo afectaba el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 sobre las fases del ciclo celular en estos cultivos, muestra que ambos fármacos provocan una acumulación en la fase G_2/M del ciclo celular a las 24 horas de tratamiento en el cultivo **HCUVA-CC-1** (Figura 54, A) y en el cultivo **HCUVA-CC-3^{CT}** (Figura 54, B).

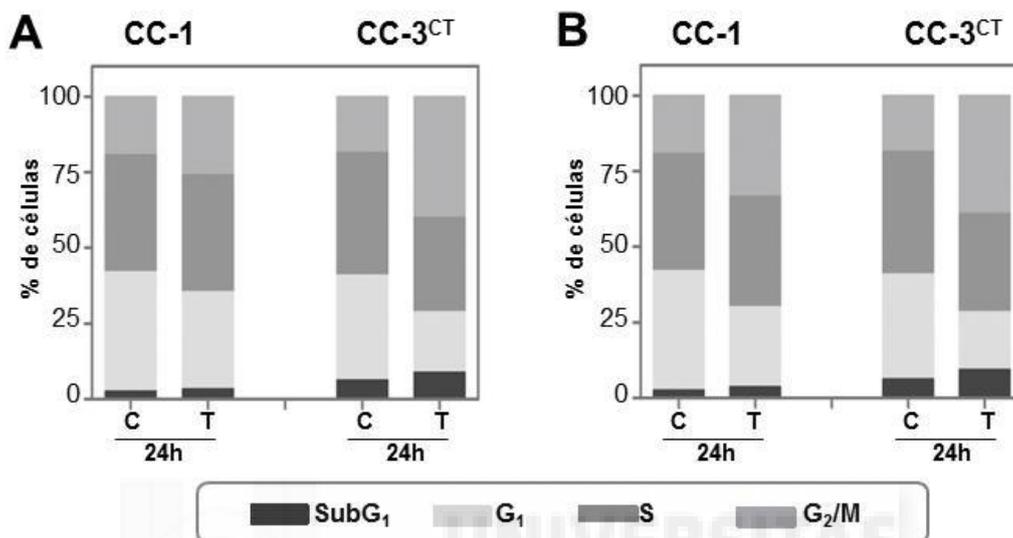


Figura 54: Distribución del contenido de ADN en las fases del ciclo celular en cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes de CCR. A) Los cultivos HCUVA-CC-1 (CC-1) y HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT}) se cultivaron y trataron con DMSO (C) o con 0,5 μ M de 17-AAG durante 24h. B) Los cultivos CC-1 y CC-3^{CT} se cultivaron y trataron con DMSO (C) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (T) durante 24h. El contenido en ADN fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo (n \geq 3).

Los resultados de los experimentos recogidos en la tabla 26 indican que en el cultivo **HCUVA-CC-1** el incremento de la fase G_2/M es de 5,3% con 17-AAG y de 10,9% con NVP-AUY922; y que en el cultivo **HCUVA-CC-3^{CT}** es de 18,6% con 17-AAG y de 17,8% con NVP-AUY922. Este incremento de la fase G_2/M se acompaña de una disminución en la fase G_1 , y una leve reducción de la fase S, con respecto a las células no tratadas, en ambos cultivos. Además, se observa un ligero aumento de la fase Sub G_1 tras el tratamiento con ambos inhibidores, aunque es menor que el causado por estos fármacos en las líneas celulares de CCR. Desafortunadamente, estos experimentos no se pudieron realizar a tiempos más largos ni en el resto de cultivo primarios.

CC-1	24h		
	control	17-AAG	NVP-AUY922
SubG ₁	2,3 ± 0,9	2,9 ± 0,8	3,1 ± 0,5
G ₁	34,4 ± 1,7	27,4 ± 5,7	22,1 ± 4,7
S	33,6 ± 4,1	33,1 ± 4,8	30,6 ± 3,9
G ₂ /M	16,9 ± 2,6	22,2 ± 8,3	27,8 ± 4,5
CC-3 ^{CT}	24h		
	control	17-AAG	NVP-AUY922
SubG ₁	6,0 ± 1,2	7,9 ± 2,1	8,5 ± 2,9
G ₁	32,5 ± 1,2	18,2 ± 2,8	17,2 ± 4,1
S	37,9 ± 1,2	28,3 ± 5,0	29,4 ± 2,0
G ₂ /M	17,5 ± 1,3	36,1 ± 4,3	35,3 ± 7,0

Tabla 26: Valores promedio para cada una de las fases del ciclo celular y SEM de los distintos experimentos (n≥3), realizados en los cultivos CC-1 y CC-3^{CT} tratados con DMSO (control) o 0,5 μM de 17-AAG o 0,1 μM de NVP-AUY922, durante 24h.

5. Estudio de la acumulación de las células en la fase G₂/M del ciclo celular producida por 17-AAG y NVP-AUY922

El estudio del efecto de los inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922, sobre las fases del ciclo celular en las líneas celulares de CP y de CCR nos reveló que ambos eran capaces de provocar un aumento de la fase G₂/M en varias de las líneas celulares. Este incremento es debido al "bloqueo" que sufren las células en esta fase del ciclo, donde quedan atrapadas, no pudiendo finalizar la división celular. A continuación, se realizaron varios ensayos para estudiar el "bloqueo" de las células en esta fase y describir cómo se produce.

5.1 Análisis de la fosforilación de la histona H3 mediante citometría de flujo

Las histonas nucleares (H3, H2B, H2A y H4) forman, junto con el ADN y otras proteínas, la cromatina, cuya unidad básica es el nucleosoma, que es considerada la estructura organizativa básica del cromosoma y el primer paso de compactación del material genético. A su vez, las histonas juegan un papel importante durante la transcripción del ARN y la replicación del ADN, por su participación en la regulación de la estructura de la cromatina [247]. Una de las modificaciones que se produce al inicio

Resultados

de la mitosis, coincidiendo con la condensación del material genético, es la fosforilación de una histona nuclear, la histona H3, y su desfosforilación coincide con la descondensación de la cromatina al finalizar la división celular [260]. Por el momento se desconoce cuáles son las funciones concretas que desempeña la Histona H3 fosforilada (fosfo-histona H3), pero se ha descrito que comienza a fosforilarse al inicio de la profase, concretamente en los residuos Ser10, Thr11 y Ser28, y se mantiene así hasta la anafase tardía, por lo que se ha convertido en un evento muy distintivo del proceso de mitosis [261]. Teniendo en cuenta esto, y para investigar si las líneas celulares que experimentaban un incremento en la fase G₂/M del ciclo celular tras el tratamiento con 17-AAG o NVP-AUY922, se acumulaban en mitosis (fase M), se determinó el porcentaje de células de la fase G₂/M que eran positivas para fosfo-histona H3 (Ser28), cuando eran expuestas a estos inhibidores de HSP90, en ensayos mediante citometría de flujo. Las líneas celulares analizadas para el estudio del efecto de 17-AAG fueron dos líneas de CP, **IMIM-PC-1** y **CFPAC-1**, ya que ambas mostraban un aumento de la fase G₂/M tras el tratamiento con este inhibidor, que comenzaba a las 24 horas (Figura 49, Tabla 22). En la línea **IMIM-PC-1** el porcentaje de células positivas para fosfo-H3 en la fase G₂/M fue tres veces superior, en concreto con un incremento de 11,4%, en las células tratadas con 17-AAG durante 24 horas que en las células no tratadas (Figura 55, A, Tabla 27). En el caso de la línea **CFPAC-1**, el porcentaje de células positivas para fosfo-histona H3 aumenta ligeramente, sólo un 2% (Figura 55, A, Tabla 27). De hecho, la acumulación en la fase G₂/M que presenta esta línea celular tras el tratamiento con 17-AAG es menor que la detectada en la línea **IMIM-PC-1** (Figura 49, Tabla 22).

Para analizar el efecto de NVP-AUY922 se eligieron tres líneas celulares (**IMIM-PC-1**, **CFPAC-1** y **Caco-2**), que experimentaban una acumulación significativa en la fase G₂/M cuando fueron tratadas con este inhibidor (Figuras 52 y 53, Tablas 24 y 25). En todas ellas, se produce un incremento de células positivas para fosfo-histona H3 en la fase G₂/M, sobre todo en la línea celular **CFPAC-1**, con un aumento de un 31,2% en comparación con las células no tratadas (Figura 55, B, Tabla 27 y Figura 56). En la línea celular **Caco-2** el porcentaje de células positivas para fosfo-histona H3 aumenta un 19,4% tras el tratamiento con NVP-AUY922 (Figura 55, B, Tabla 27), y el incremento en

la línea celular **IMIM-PC-1** es de un 7,7% (Figura 55, B, Tabla 27), similar al producido por el tratamiento con 17-AAG en esta línea celular.

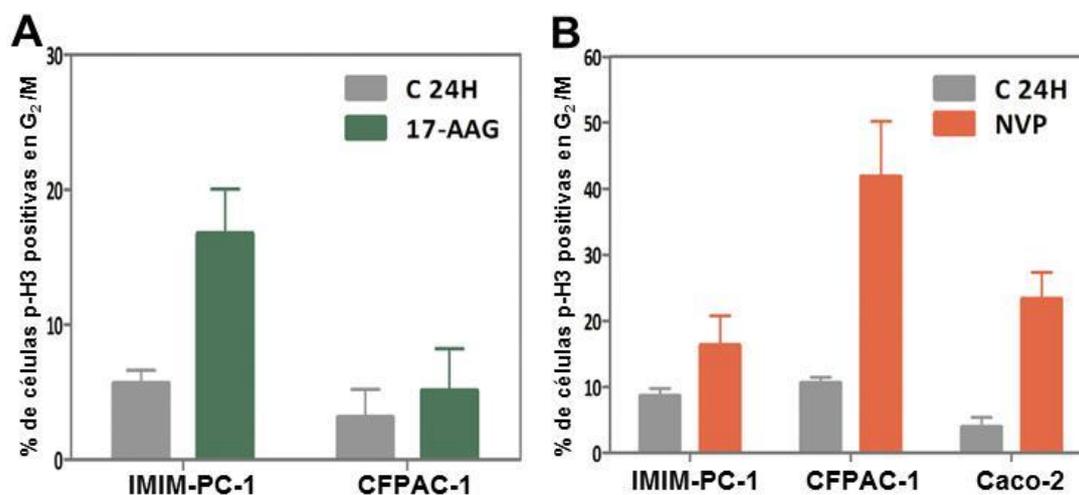


Figura 55: Efectos de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre la fosforilación (Ser28) de la histona H3. (A) Las líneas celulares de CP, IMIM-PC-1 y CFPAC-1, se cultivaron y trataron con DMSO (C 24h) o 0,5 μ M de 17-AAG (17-AAG) durante 24h. (B) Las líneas celulares de CP, IMIM-PC-1 y CFPAC-1, y línea de CCR, Caco-2 se cultivaron y trataron con DMSO (C 24h) o 0,1 μ M de NVP-AUY922 (NVP) durante 24h. El contenido de células positivas para fosfo-histona H3 (Ser28) (p-H3) en la fase G₂/M fue determinado, al tiempo que se analizaba el perfil de ciclo celular, mediante citometría de flujo en al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3 \pm$ SEM).

Línea celular	17-AAG		NVP-AUY922	
	Control 24h	0,5 μ M	Control 24h	0,1 μ M
IMIM-PC-1	5,3 \pm 0,9	16,7 \pm 3,3	8,6 \pm 1,2	16,3 \pm 4,6
CFPAC-1	3,1 \pm 2,1	5,1 \pm 3,1	10,6 \pm 0,9	41,8 \pm 8,3
Caco-2	--	--	3,9 \pm 1,5	23,3 \pm 4,1

Tabla 27: Valores promedio ($n \geq 3$) y SEM del porcentaje de células positivas para fosfo-histona H3 (Ser 28) en la fase G₂/M del ciclo celular, determinados mediante citometría de flujo.

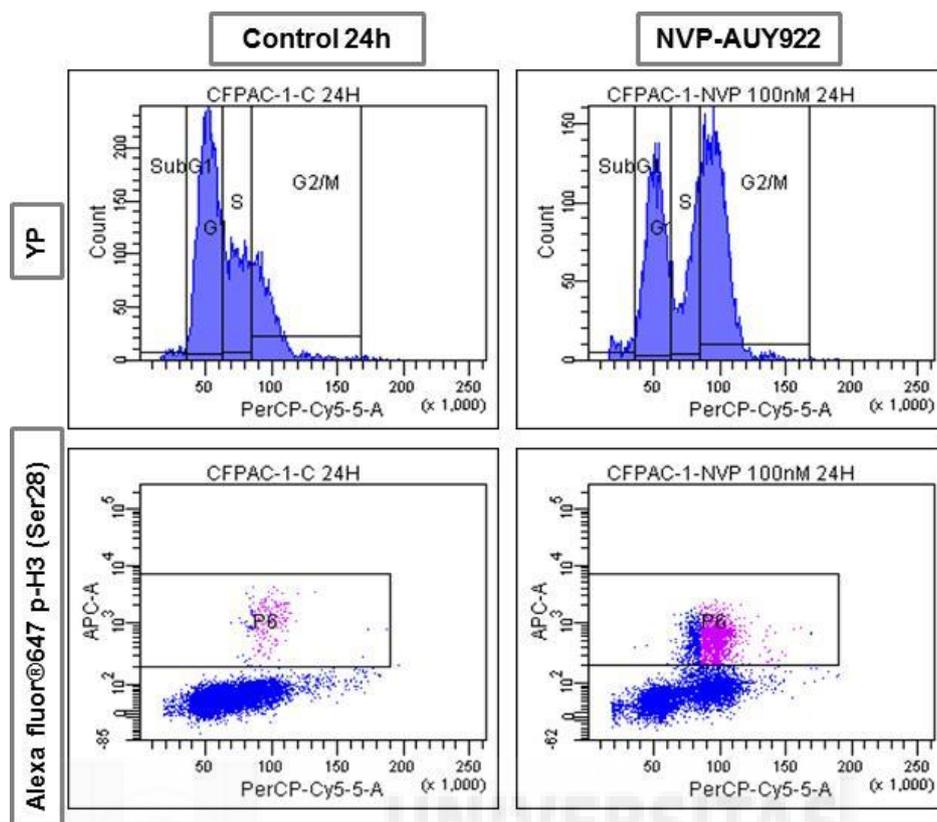


Figura 56: Histogramas del ciclo celular e histona H3 fosforilada (Ser28) tras el tratamiento con NVP-AUY922. La línea celular CFPAC-1 se cultivó y trató con DMSO (Control 24h) o 0,1 μ M de NVP-AUY922 durante 24h. El contenido de células positivas para fosfo-histona H3 (Ser28) (p-H3) en la fase G₂/M fue determinado tras la fijación y tinción de las células con Alexa Fluor®647 anti-Histona H3 fosforilada (Ser28) (p-H3), al mismo tiempo que se analizaba el perfil de ciclo celular con tinción de yoduro de propidio (YP), mediante citometría de flujo.

5.2 Análisis de la fosforilación de la histona H3 mediante microscopía de fluorescencia

Paralelamente al anterior ensayo, las tres líneas celulares analizadas en los ensayos de citometría de flujo (IMIM-PC-1, CFPAC-1 y Caco-2) fueron tratadas con 17-AAG o NVP-AUY922 durante 24 horas, y posteriormente incubadas con anticuerpos frente a α -tubulina y fosfo-histona H3 para observar si se producían cambios en las figuras mitóticas tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90 mediante microscopía de fluorescencia. En estos experimentos, se estudió la fosforilación de la histona H3 en el residuo Ser10, y se incluyó la detección de α -tubulina, proteína que forma parte de los filamentos de los microtúbulos del huso mitótico. Tras el tratamiento con 17-AAG, se observa un considerable aumento de núcleos positivos para fosfo-histona H3 (Ser10) en la línea IMIM-PC-1 (Figura 58, A), en concreto de un 16,4% con respecto a las células no tratadas, y un leve incremento en las líneas CFPAC-1 (4,3%) y Caco-2 (1,1%) (Figura

58, B y C, Tabla 28). El menor incremento de fosfo-histona H3 que presentan las líneas **CFPAC-1** y **Caco-2** se puede asociar con su menor acumulación en la fase G₂/M, tras el tratamiento con 17-AAG (Figuras 49 y 51, Tablas 22 y 23).

Así mismo, el tratamiento con NVP-AUY922 provoca un aumento considerable de núcleos positivos para fosfo-histona H3 en las tres líneas analizadas, con respecto a las células no tratadas, en las líneas **IMIM-PC-1** (17,9%) y **CFPAC-1** (11,8%) (Figura 58, A y B, Tabla 28), y en la línea **Caco-2** el incremento fue más leve (5%) (Figura 58, C, Tabla 28). En las tres líneas celulares tras el tratamiento con este fármaco hay un mayor porcentaje de células que han alcanzado la fase de mitosis (M). Además de las líneas celulares mencionadas, también se analizó el número de núcleos positivos para fosfo-histona H3 (Ser10) en un cultivo primario, **HCUVA-CC-1**. En este cultivo también se determinó una ligera acumulación de las células en la fase G₂/M del ciclo celular cuando fue tratado con ambos fármacos durante 24 horas (Figura 54, Tabla 26). Los resultados de este ensayo indican que se produce un leve incremento de fosfo-histona H3 (Ser10) tras el tratamiento de 17-AAG, con un incremento de un 2,6% con respecto a las células no tratadas, y con NVP-AUY922 el incremento es un poco superior, alcanzando un 3,4% (Figura 58, D, Tabla 28).

Línea celular	C 24h	17-AAG	NVP-AUY922
		0,5 µM	0,1 µM
IMIM-PC-1	5,0	21,4	22,9
CFPAC-1	2,6	6,9	14,4
Caco-2	5,5	6,6	10,5
HUVA-CC-1	5,1	7,7	8,5

Tabla 28: Porcentaje de núcleos positivos para fosfo-histona H3 (Ser10). Los núcleos fueron contados tanto en las células tratadas con DMSO (C 24h), y en las células tratadas con 0,5 µM de 17-AAG o 0,1 µM de NVP-AUY922 durante 24h.

Además de determinar que varias de las líneas celulares tratadas con 17-AAG y NVP-AUY922 (**IMIM-PC-1**, **CFPAC-1** y **Caco-2**) presentaban un incremento, en mayor o menor medida, de células positivas para fosfo-histona H3 (Ser28 y Ser10), al visualizar con más detalle las figuras mitóticas formadas en las células tratadas, se observa que no tienen una apariencia similar a las formadas en las células sin tratamiento (Figura 57, A).

Resultados

De hecho, los núcleos en mitosis observados en las células tratadas presentan unas morfologías anormales o aberrantes (Figura 57, B y C).

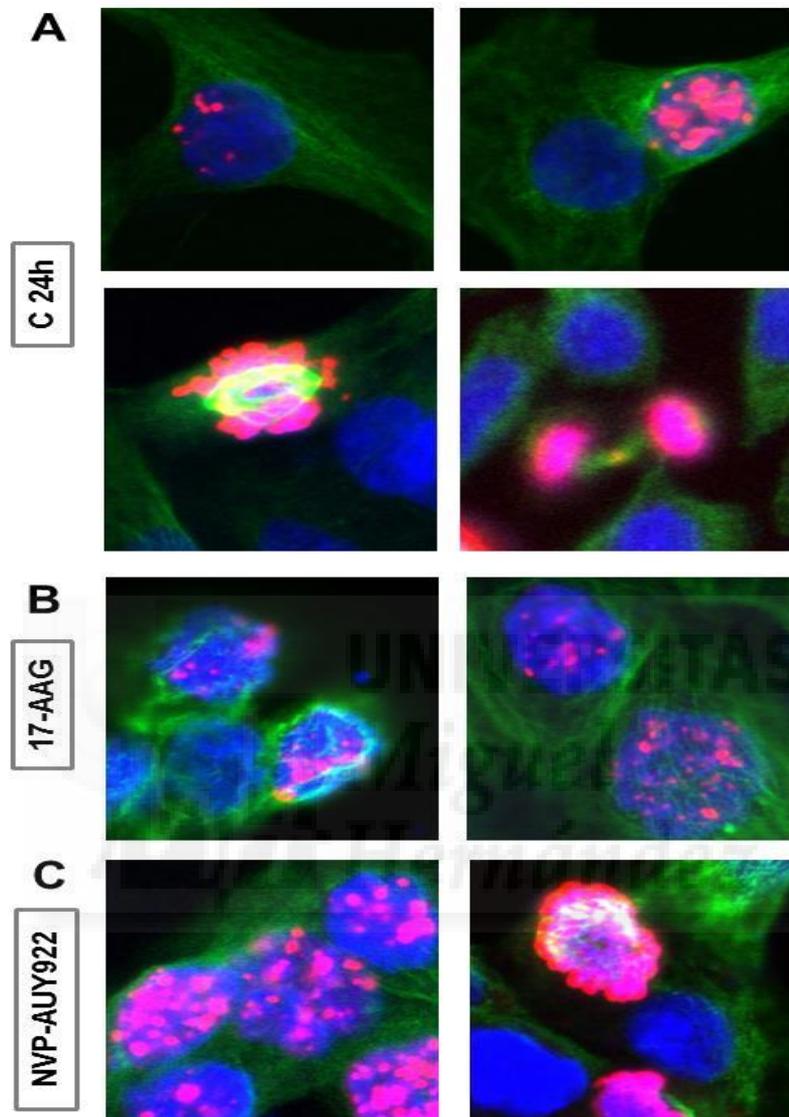
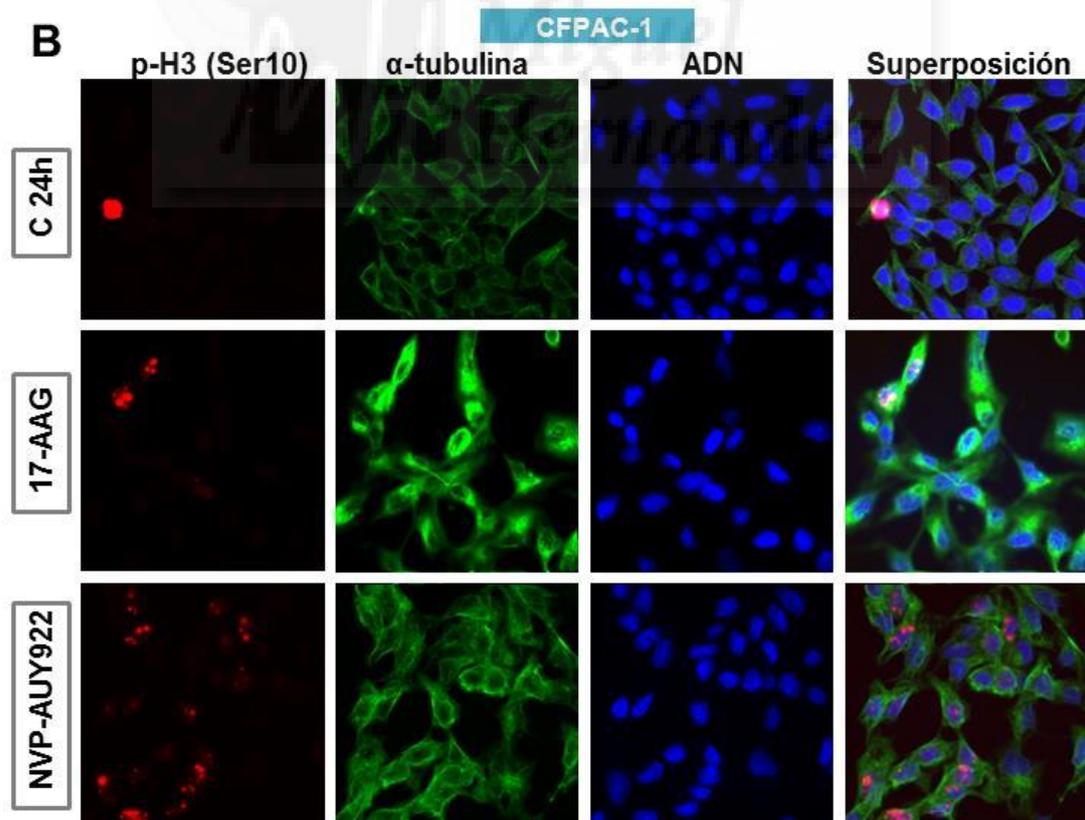
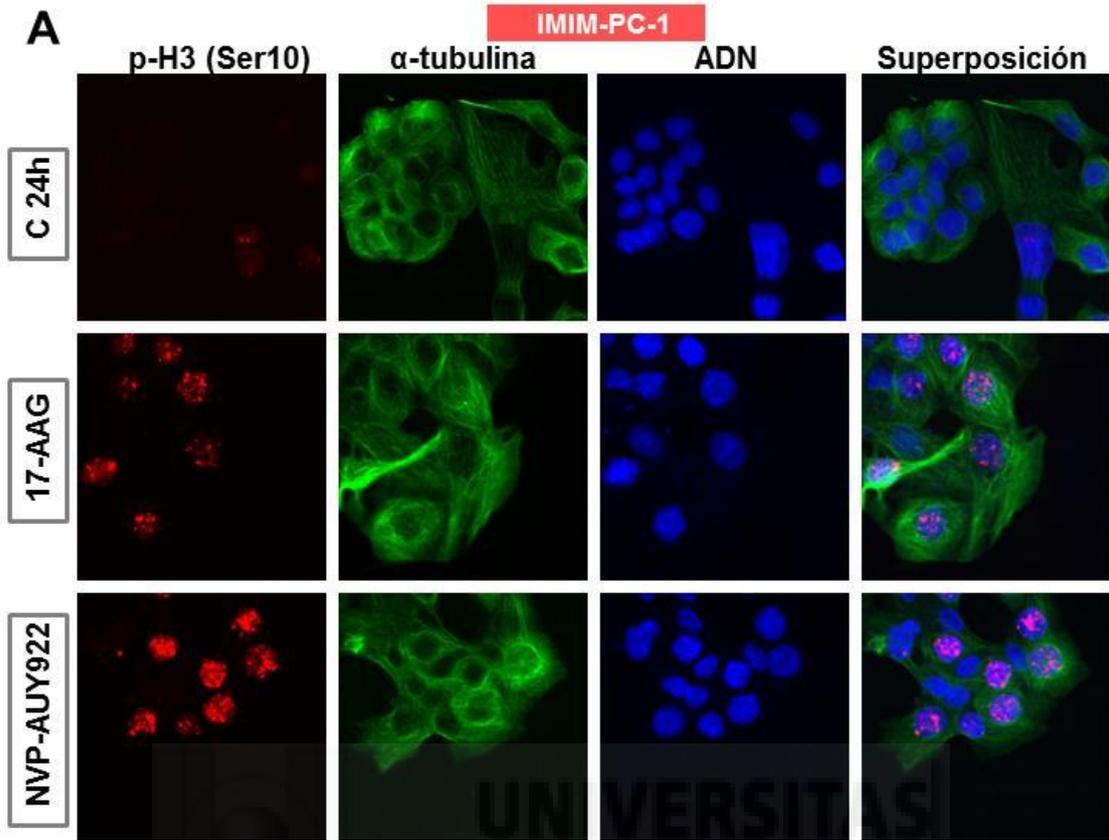
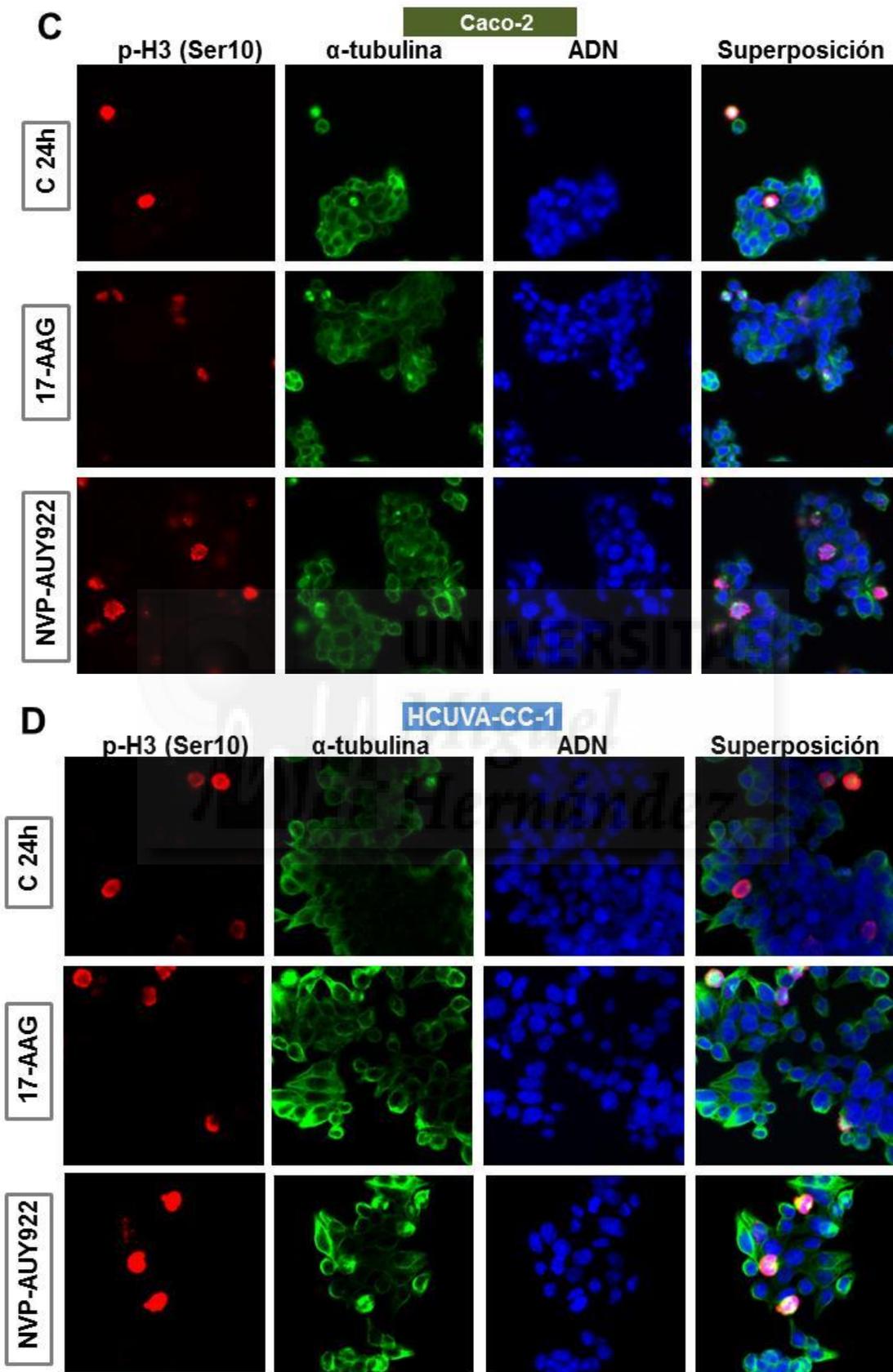


Figura 57: Figuras mitóticas formadas en una línea celular tras el efecto de 17-AAG y NVP-AUY922. Las células IMIM-PC-1 se trataron durante 24 horas con DMSO (A, C 24h), o 0,5 μM de 17-AAG (B, 17-AAG) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (C, NVP-AUY922), y se incubaron con anticuerpos primarios frente a fosfo-histona H3 (Ser10) y a α -tubulina, y posteriormente con anticuerpos secundarios Alexa Fluor[®] 488 α -ratón, Alexa Fluor[®] 568 α -conejo, y el fluoróforo Hoechst 33342 para el marcaje de la cromatina. Los núcleos se fotografiaron mediante microscopía confocal (objetivo 60X) para observar las diferencias entre las células no tratadas (A) y las tratadas con 17-AAG (B) o con NVP-AUY922 (C). En las células sin tratamiento (A) se observan figuras mitóticas que podrían corresponder a la primera fase de la mitosis, profase (dos primeras imágenes), y a la metafase (tercera imagen) y anafase tardía (cuarta imagen).



Nota: Pie de Figura en página 153.



Nota: Pie de Figura en página 153.

Figura 58: Análisis por microscopía confocal de fluorescencia del efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 en líneas celulares de CP, de CCR y cultivos primarios derivados de muestras tumorales de pacientes. Las células se trataron durante 24 horas con DMSO (C 24h) o 0,5 μ M de 17-AAG (17-AAG) o 0,1 μ M de NVP-AUY922, y se incubaron con anticuerpos primarios frente a fosfo-histona H3 (Ser10) y a α -tubulina, y posteriormente con anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 α -ratón, Alexa Fluor® 568 α -conejo, y el fluoróforo Hoechst 33342 para el marcaje de la cromatina. Los núcleos se fotografiaron mediante microscopía confocal (objetivo 60X) para analizar las diferencias entre las células tratadas y las no tratadas. Las líneas celulares de CP analizadas fueron IMIM-PC-1 (A), CFPAC-1 (B), la línea celular de CCR, Caco-2 (C), y el cultivo primario HCUVA-CC-1 (D).

5.3 Estudio de los efectos de NVP-AUY922 en los niveles de proteínas implicadas en el avance de las células de la fase G₂ hacia la fase M

El avance a través del ciclo celular es producido por la activación de diferentes quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que fosforilan proteínas esenciales para cada paso del ciclo celular. Para llevar a cabo sus funciones, las Cdks se asocian con las ciclinas, que son subunidades reguladoras sin actividad enzimática. La transición entre la fase G₂ y M está regulada por la activación de un complejo formado por la ciclina B y la quinasa dependiente de ciclina, Cdc2 (CDK1). Este complejo comienza a formarse durante fase S y G₂, e inicialmente se encuentra en estado inactivo debido a la fosforilación de Cdc2 en el residuo tirosina 15 (Tyr15) y treonina 14 (Thr14) [262]. Pero si estos residuos son desfosforilados, el complejo se activa y se inicia la mitosis [263]. La ciclina B actúa como una proteína reguladora de la actividad quinasa de Cdc2 y es degradada al finalizar el proceso de mitosis [264]. Cuando las células están preparadas para dividirse, el complejo ciclina B/Cdc2 se activa y conduce a las células hacia la fase M del ciclo celular. Dado que, tanto Cdc2 como la ciclina B1 son proteínas clientes de HSP90, decidimos analizar sus niveles de expresión tras la inhibición de HSP90. El estudio de estas proteínas fue evaluado tras el tratamiento con NVP-AUY922, dado que todas las líneas celulares incluidas en el estudio responden a este inhibidor, que además provoca un "bloqueo" en la fase G₂/M del ciclo celular en muchas de ellas. Para la realización de estos experimentos se utilizaron dos líneas celulares que experimentan una acumulación significativa en la fase G₂/M tras el tratamiento con NVP-AUY922, una línea celular de CP, **CFPAC-1** y una línea celular de CCR, **Caco-2**, y las dos fueron tratadas con NVP-AUY922 (0,1 μ M) durante 4, 8, 16 o 24 horas. Los resultados mediante Western blot muestran una disminución en la fosforilación de Cdc2 (fosfo-Cdc2) en el residuo tirosina 15 (Tyr15) en ambas líneas (Figura 59). Esta disminución comienza

Resultados

siendo leve a las 4 horas de tratamiento, y se incrementa tras un tiempo mayor de exposición al inhibidor. El tratamiento con NVP-AUY922 también provoca una disminución progresiva de los niveles totales de Cdc2, alcanzando una reducción bastante considerable tras 24 horas de tratamiento en las dos líneas celulares (Figura 59). El densitometrado de los niveles de fosfo-Cdc2 (Tyr15) y los niveles de expresión de Cdc2 tras el tratamiento con NVP-AUY922, revela que la disminución, tanto del estado de fosforilación de Cdc2 como de sus niveles totales, en ambas líneas celulares es directamente proporcional al tiempo de exposición al fármaco (Figura 60, Tabla 29). Por tanto, el tratamiento con NVP-AUY922 afecta tanto al estado de fosforilación de Cdc2, como a sus niveles de expresión.

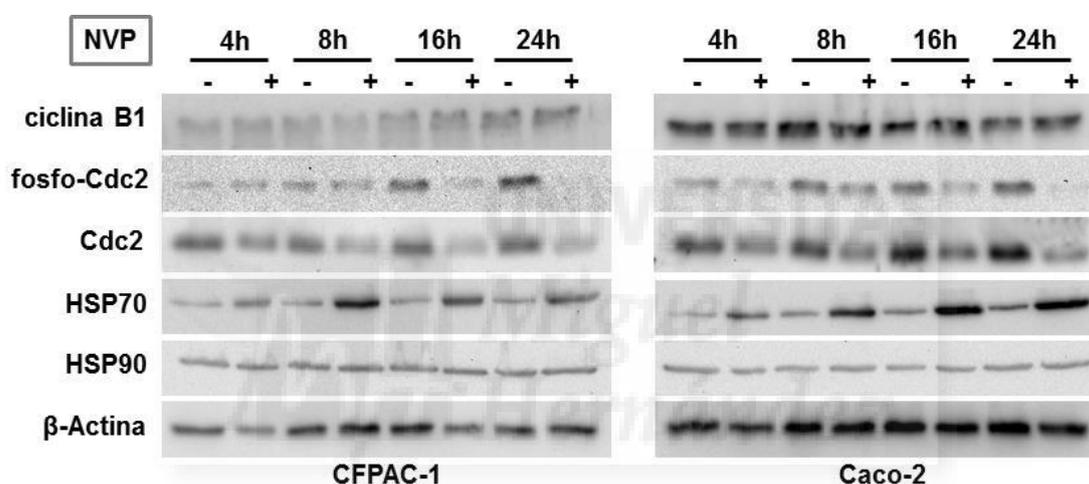


Figura 59: Efecto del inhibidor NVP-AUY922 sobre las proteínas relacionadas con la transición G₂/M del ciclo celular. Los niveles de expresión de las proteínas estudiadas se determinaron en la línea celular de CP CFPAC-1, y en la línea de CCR Caco-2, en respuesta al tratamiento durante un curso temporal de 4, 8, 16 y 24 horas con DMSO (-) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (+). Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente a ciclina B1, fosfo-Cdc2 (Tyr15), Cdc2, HSP70 y HSP90. β-actina fue utilizada como control de carga para todas las condiciones. La imagen corresponde a experimentos representativos.

Así mismo, se analizaron los niveles de expresión de la ciclina B1 en las líneas celulares **CFPAC-1** y **Caco-2**, pero aunque esta proteína también es cliente de HSP90 como Cdc2, en este caso los niveles de expresión apenas varían y no se modifican tras el tratamiento con NVP-AUY922 (Figura 59). Además, se incluyó el estudio de los niveles de HSP70 y HSP90 en el curso temporal (4, 8, 16 y 24h) para ambas líneas celulares. Los niveles de HSP70 aumentan progresivamente con un mayor incremento de exposición

al fármaco, indicando que hay inhibición de HSP90, y los niveles de HSP90 no se modifican con el tratamiento (Figura 59).

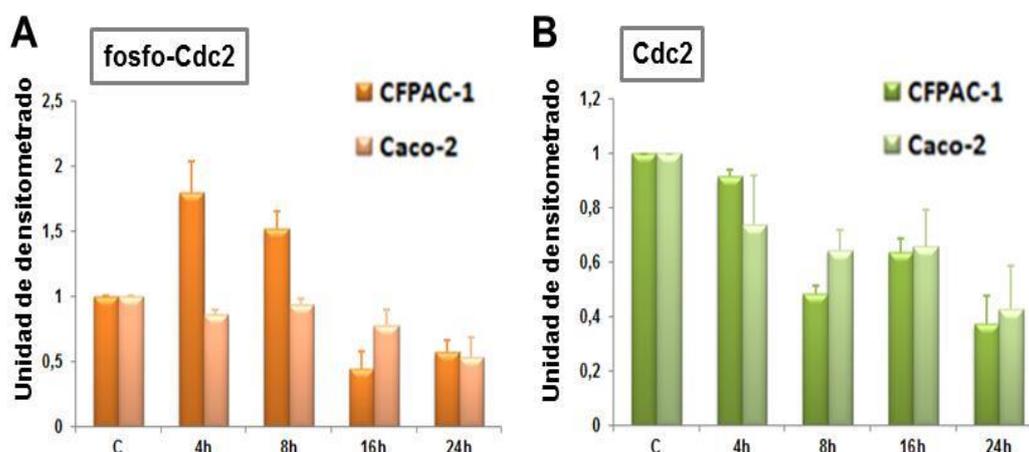


Figura 60: Densitometrado de los niveles de fosfo-Cdc2 (Tyr15) y Cdc2 tras el tratamiento con el inhibidor NVP-AUY922. Los gráficos de barras representan el nivel promedio de los niveles de fosforilación de la proteína Cdc2 (A) normalizados frente a los niveles de proteína total de Cdc2, y de proteína Cdc2 total (B) normalizados frente al control de carga, obtenidos a partir del análisis de densitometría de al menos tres experimentos ($n \geq 3$) \pm SEM. A cada control de cada tiempo se le asignó el valor de 1 (se representa en la primera columna), y los valores de cada banda fueron obtenidos para cada condición.

Línea celular	Tiempo (h)	fosfo-Cdc2	Cdc2 total
CFPAC-1	4	1,79 \pm 0,24	0,91 \pm 0,02
	8	1,52 \pm 0,13	0,48 \pm 0,03
	16	0,44 \pm 0,14	0,63 \pm 0,05
	24	0,57 \pm 0,09	0,37 \pm 0,10
Caco-2	4	0,86 \pm 0,04	0,74 \pm 0,18
	8	0,93 \pm 0,05	0,64 \pm 0,08
	16	0,78 \pm 0,13	0,66 \pm 0,14
	24	0,53 \pm 0,15	0,43 \pm 0,16

Tabla 29: Valores de los niveles de fosfo-Cdc2 (Tyr15) y Cdc2 tras el tratamiento con el inhibidor NVP-AUY922. El promedio \pm SEM de los niveles de fosforilación de la proteína Cdc2 y de proteína Cdc2 total obtenidos a partir del análisis de densitometría de al menos tres experimentos ($n \geq 3$) han sido calculados para 4, 8, 16 y 24 horas de tratamiento con NVP-AUY922 para las líneas celulares CFPAC-1 y Caco-2, con respecto a las células no tratadas (valor =1). Estos valores han sido representados en la Figura 60.

Resultados

Además de los experimentos realizados en líneas celulares, también se analizaron los niveles de expresión y fosforilación (Tyr15) de Cdc2 y de ciclina B1 en varios cultivos primarios. Los cultivos estudiados fueron **HCUVA-CC-1** y **HCUVA-CC-3^{CT}**, donde previamente se habían analizado los cambios provocados por NVP-AUY922 en las fases del ciclo celular, como se explicó en el apartado 4.3. En ambos casos se determinó un aumento de la fase G₂/M con respecto al control de 10,9% y 17,8%, respectivamente, tras el tratamiento con NVP-AUY922 durante 24 horas (0,1 μM) (Figura 54, Tabla 26). Al analizar los niveles de proteínas en los cultivos tratados con NVP-AUY922 durante 24 horas se observa una disminución tanto de los niveles totales de Cdc2, como de su fosforilación (Tyr15) (Figura 61), al igual que se observó en las líneas celulares analizadas (Figura 59). Por otro lado, los niveles de ciclina B1 y de HSP90, como ocurre en las líneas celulares, no varían tras el tratamiento, mientras que los niveles de expresión de HSP70 aumentan en los dos cultivos (Figura 61).

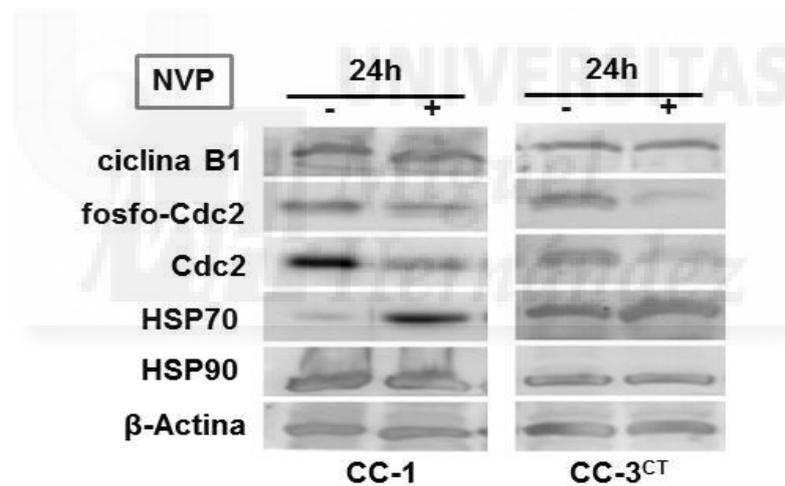


Figura 61: Efecto del inhibidor NVP-AUY922 sobre las proteínas relacionadas con la transición G₂/M del ciclo celular en cultivos primarios. Los niveles de expresión de las proteínas estudiadas se determinaron en los cultivos primarios HCUVA-CC-1 (CC-1) y HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT}) en respuesta al tratamiento durante 24 horas con DMSO (-) o 0,1 μM de NVP-AUY922 (+). Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente ciclina B1, fosfo-Cdc2 (Tyr15), Cdc2, HSP70 y HSP90. β-actina fue utilizada como control de carga para todas las condiciones. La imagen corresponde a experimentos representativos.

5.4 Estudio de los efectos de NVP-AUY922 sobre la fase G₂/M en células sincronizadas

No todas las células de una población celular en periodo proliferativo se encuentran en la misma fase del ciclo celular. Para estudiar el efecto de la inhibición de HSP90 sobre células que están en el mismo punto del ciclo celular, y así confirmar los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en células que se encuentran en diferentes puntos del ciclo, se realizaron experimentos en células sincronizadas tratadas con NVP-AUY922. Para ello, se seleccionó una línea celular, **CFPAC-1**, que fue sincronizada tras el tratamiento con afidicolina durante 24 horas, tal y como se describe en Materiales y Métodos. De este modo, toda la población celular parte desde un mismo punto del ciclo celular, en concreto al inicio de la replicación celular, al límite entre la fase G₁ y S. Tras la sincronización, las células fueron tratadas a diferentes tiempos con NVP-AUY922 (0,1 μ M) y se analizó la distribución de las células en las fases del ciclo celular por medio de citometría de flujo (Figura 62).

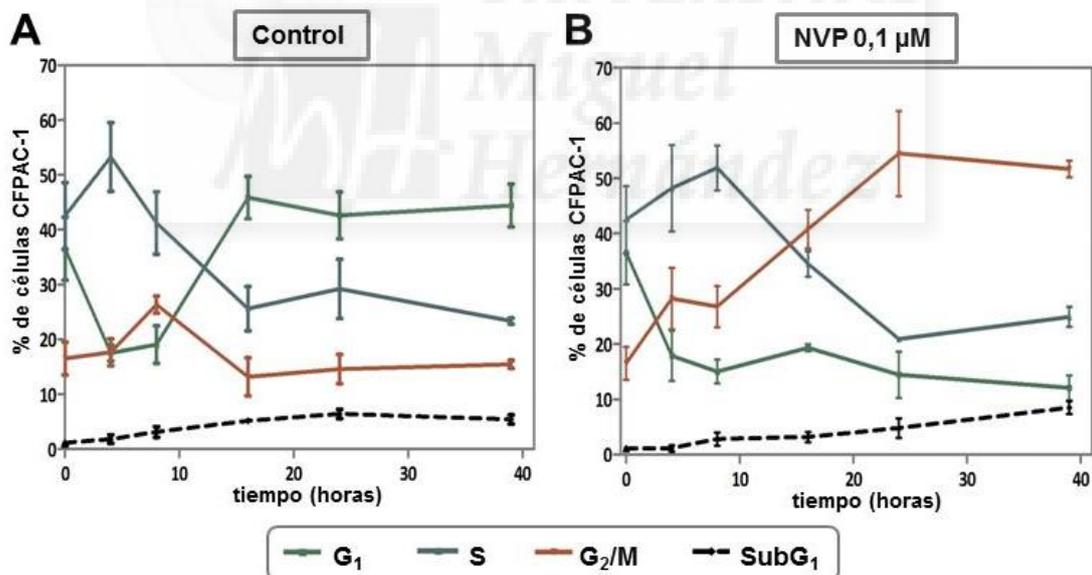


Figura 62: Efectos de NVP-AUY922 sobre las fases del ciclo celular en la línea celular de CP CFPAC-1 tras su sincronización. Las células se cultivaron y trataron con afidicolina (1 μ g/ml) durante 24 horas. Posteriormente, se liberaron del bloqueo en G₁/S y de nuevo se trataron con vehículo (DMSO) (A) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (B) durante diferentes tiempos (4, 8, 16, 24 y 39 horas). La distribución en el ciclo celular del contenido de ADN fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo, en al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3 \pm$ SEM).

Resultados

Los resultados de los experimentos muestran que las células **CFPAC-1** sincronizadas y posteriormente tratadas, se acumulan o quedan "bloqueadas" en la fase G_2/M del ciclo, al contrario que las células sin tratar, que tras la retirada del fármaco afidicolina y salir de la transición G_1/S , vuelven a manifestar una distribución normal en el ciclo celular (Figura 62).

Además, en la misma línea celular, **CFPAC-1**, también se analizaron los niveles de expresión de proteína Cdc2 total y de su estado de fosforilación (Tyr15), tras ser sincronizadas con afidicolina, del mismo modo que se realizó el estudio de las fases del ciclo celular. Los resultados de estos experimentos determinaron que se produce una disminución de los niveles de Cdc2 total y Cdc2 fosforilada (Figura 63), al igual que ocurrió en esta línea celular sin sincronizar, cuando fueron tratadas con NVP-AUY922 durante 24 horas (Figura 59).

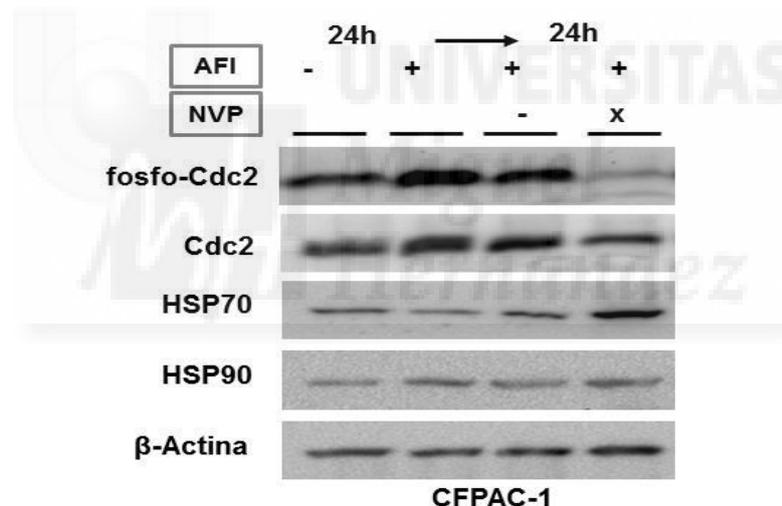


Figura 63: Efecto de NVP-AUY922 sobre los niveles totales de Cdc2 y su forma fosforilada en la línea celular de CP CFPAC-1 tras ser sincronizada. Las células se cultivaron y trataron con DMSO (-) o afidicolina (AFI) (1 μ g/ml) (+) durante 24 horas. Posteriormente, se liberaron del bloqueo en G_1/S y se trataron con DMSO (-) o con 0,1 μ M de NVP-AUY922 (NVP) (x) durante 24 horas. Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos frente fosfo-Cdc2 (Tyr15), Cdc2, HSP70 y HSP90. β -actina fue utilizada como control de carga para todas las condiciones.

Asimismo, también se produce un leve aumento de fosfo-Cdc2 (Tyr15) en las células tratadas sólo con afidicolina, que puede ser debido a que las células están retenidas en la fase G_1/S , no se están dividiendo y no pueden avanzar hacia la fase G_2/M . En este caso, Cdc2 se encontraría inactivada, es decir, fosforilada en Tyr15. Además, los datos obtenidos en las células sincronizadas confirmaron que la reducción

de los niveles de Cdc2 y fosfo-Cdc2 (Tyr15) eran debidos a un efecto específico del inhibidor de HSP90. Además, los niveles de expresión de HSP70 aumentan tras el tratamiento con NVP-AUY922, al contrario que los niveles de HSP90 que no cambian (Figura 63).

6. Estudio del incremento de la fase SubG₁ producida por 17-AAG y NVP-AUY922

El tratamiento con los inhibidores de HSP90 generó un aumento de la fase SubG₁ en algunas de las líneas celulares de CP y CCR, sugiriendo que se producía muerte celular a consecuencia de esta inhibición. Teniendo en cuenta este hecho, se quiso analizar si 17-AAG y NVP-AUY922 inducían un mecanismo de muerte apoptótica en las líneas celulares. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada en la que la célula participa de forma activa y ocurre bajo condiciones fisiológicas, sin producir una respuesta inflamatoria [143, 144]. Para determinar si las células tratadas con estos inhibidores de HSP90 sufrían este mecanismo de muerte celular se realizaron ensayos con el marcador de apoptosis temprana Anexina V. Como se ha explicado en Materiales y Métodos (apartado 3.4), este ensayo se basa en la pérdida de asimetría que sufre la membrana celular durante el proceso apoptótico, trasladando al exterior celular el fosfolípido fosfatidilserina (FS), que pueden ser detectado por la proteína Anexina V conjugada con un fluorocromo [250, 251]. Por el contrario, los colorantes vitales como 7-AAD penetran fácilmente en las células necróticas, pero no en las células que aún mantienen su membrana celular intacta, por lo que la utilización de ambos puede ser usada para diferenciar entre células que están sufriendo un proceso apoptótico de células necróticas. Aunque hay que tener en cuenta que células en fases tardías de la apoptosis han perdido parte de la integridad de la membrana celular y permiten la entrada del colorante 7-AAD.

Además, existen cambios morfológicos asociados a una muerte apoptótica, y unos de los más característicos son los que se producen en el núcleo. Los cambios en el núcleo comienzan con condensación de la cromatina nuclear que forma cúmulos densos en la periferia del núcleo. A continuación, se produce fragmentación nuclear y la formación de invaginaciones de la membrana plasmática y la membrana nuclear. Como consecuencia de estas invaginaciones, aparecen los cuerpos apoptóticos, que pueden

Resultados

estar formados por cantidades variables de fragmentos nucleares junto con otros componentes citoplasmáticos [143, 144]. Finalmente, los cuerpos apoptóticos *in vivo* pueden ser eliminados mediante fagocitosis, evitando la inflamación de la zona.

6.1 Análisis de la muerte celular producida por 17-AAG

Para estudiar el aumento de la fase SubG₁ provocado por el tratamiento de 17-AAG, se seleccionó la línea celular IMIM-PC-2, que presentaba un considerable incremento de células (9,3%) en esta fase tras 24 horas de exposición a 17-AAG, con respecto a las células no tratadas (Tabla 22). Tanto las células control como las tratadas se incubaron con Anexina V-FITC y 7-AAD, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos indican que 17-AAG induce un incremento considerable ($16,4 \pm 4,3\%$) de células marcadas con Anexina V (FITC +/ 7-AAD -) con respecto a las células sin tratar (Figura 65), es decir, de células en apoptosis temprana. Además, también hay un pequeño porcentaje de células que se marcan con Anexina V-FITC y 7-AAD ($5,5 \pm 0,8\%$), por lo que hay un porcentaje de células que han perdido la integridad de su membrana, y puede representar presencia de células necróticas o de células que han alcanzado una fase tardía de la apoptosis. Por otro lado, el porcentaje de células marcadas solamente con 7-AAD (FITC-/7-AAD+), que indica la presencia de células necróticas, es casi inexistente ($0,2 \pm 0,2$) (Figura 65).

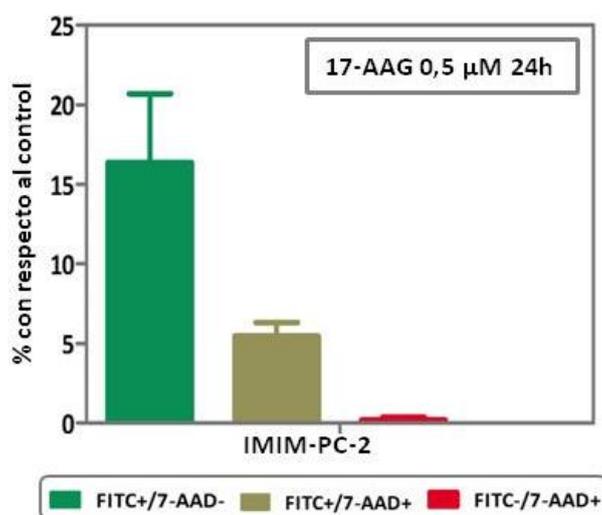


Figura 64: Porcentaje de células IMIM-PC-2 marcadas con Anexina V y/o 7-AAD tras el tratamiento con 17-AAG. La línea celular de CP IMIM-PC-2 se cultivó y trató con DMSO o con 0,5 μ M de 17-AAG durante 24 horas. El contenido de células marcadas para Anexina V-FITC y 7-AAD fue determinado mediante citometría de flujo. El valor de cada columna representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3$) con respecto a su control.

El estado de integridad de la cromatina también puede ser estudiado para determinar si las células están experimentando una muerte apoptótica, ya que durante la apoptosis la cromatina se condensa y se fragmenta. En nuestro estudio, se usó el fluorocromo Hoechst 33342, que se intercala en el ADN celular y hace posible visualizar el estado de la cromatina mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, la misma línea celular utilizada en el ensayo anterior, **IMIM-PC-2**, fue tratada con 17-AAG (0,5 μ M) durante 24 horas, y tanto los núcleos de las células sin tratamiento como los de las células tratadas con 17-AAG fueron analizados. En las imágenes se puede apreciar cómo las células tratadas presentan núcleos con condensación y fragmentos de cromatina (3,9%) en un porcentaje superior al determinado para las células no tratadas (0,2%) (Figura 65).

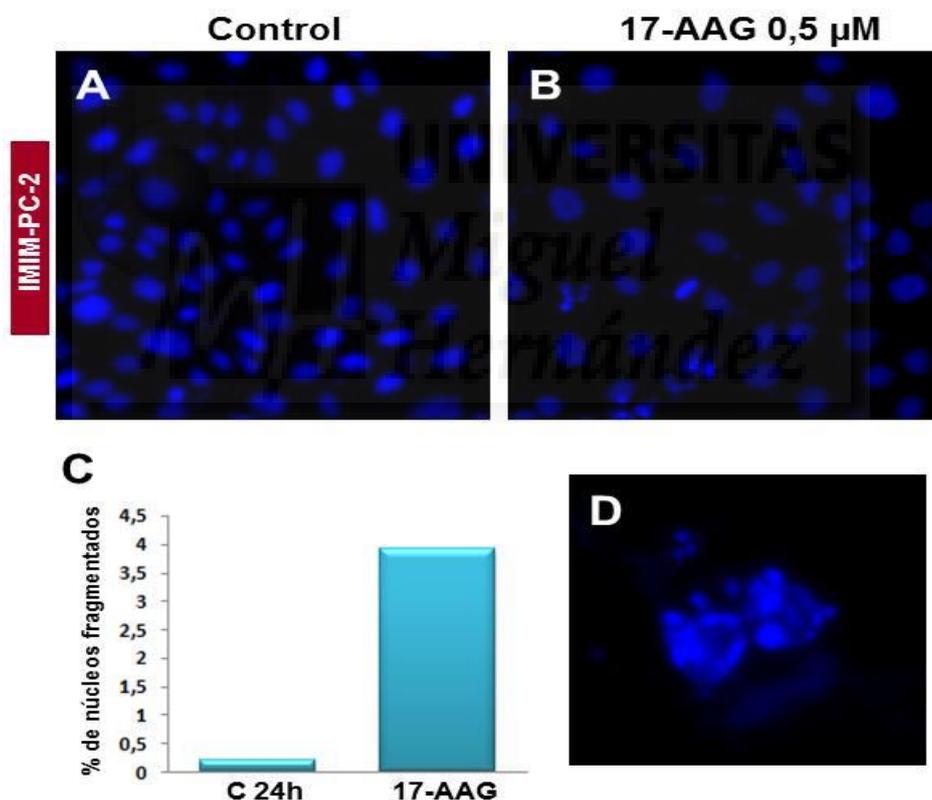


Figura 65: Estudio mediante microscopía de fluorescencia del efecto de 17-AAG sobre la integridad de la cromatina. La línea celular de CP IMIM-PC-2 se cultivó y trató con DMSO (A) o 0,5 μ M de 17-AAG (B), y posteriormente se incubó con el fluoróforo Hoechst 33342 para el marcaje de la cromatina. El porcentaje de núcleos con fragmentación de cromatina se calculó para ambas condiciones (C). Las imágenes se tomaron mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 20X), y un núcleo con condensación y fragmentación de cromatina representativo se ha magnificado (D).

6.2 Análisis de la muerte celular producida por NVP-AUY922

Del mismo modo que se realizaron los ensayos con el marcador de Anexina V en células tratadas con 17-AAG, también se realizó este tipo de ensayo en líneas celulares que experimentaban aumento de la fase SubG₁ del ciclo celular después de ser tratadas con NVP-AUY922. En este caso, las líneas seleccionadas fueron **IMIM-PC-2** y **CFPAC-1**, en las cuales la fase SubG₁ aumenta un 7,5% y un 4,7%, respectivamente, tras el tratamiento de NVP-AUY922 durante 24 horas (Tabla 24). En estos ensayos, los resultados manifestaron que estas dos líneas presentaban un comportamiento diferente tras el tratamiento con NVP-AUY922. Mientras que las células **IMIM-PC-2** presentan un considerable aumento de células marcadas solamente con Anexina V ($14,9 \pm 3,1\%$) respecto al control, que indica que las células están experimentando un proceso de apoptosis, la línea **CFPAC-1** sólo presenta un $1,6 \pm 0,7\%$ de células con respecto al control en esta situación (Figura 66).

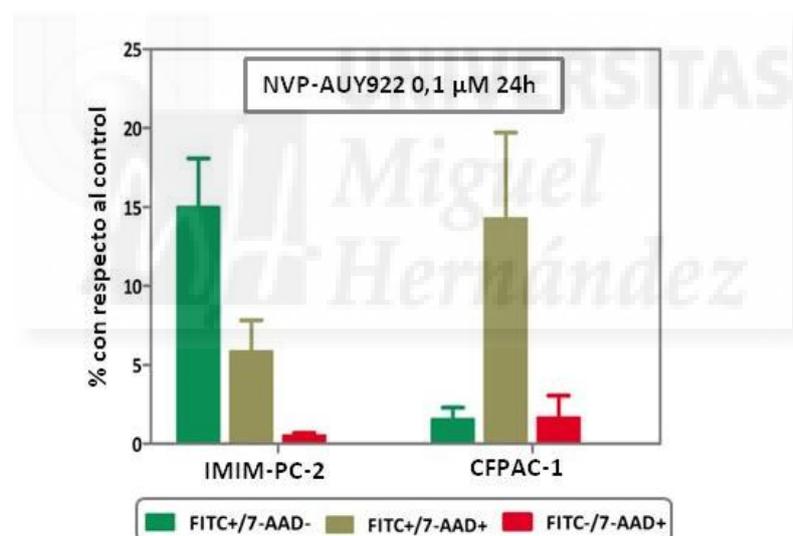


Figura 66: Porcentaje de células IMIM-PC-2 y CFPAC-1 marcadas con Anexina V y/o 7-AAD tras el tratamiento con NVP-AUY922. Las líneas celulares de CP IMIM-PC-2 y CFPAC-1 se cultivaron y trataron con DMSO o con 0,1 μM de NVP-AUY922 durante 24 horas. El contenido de células marcadas para Anexina V-FITC y 7-AAD fue determinado mediante citometría de flujo. El valor de cada columna representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3$) con respecto a su control.

Por otro lado, si observamos las células marcadas con Anexina V-FITC y con 7-AAD (FITC+/7-AAD+), la línea celular **IMIM-PC-2** presenta un leve incremento de células marcadas por ambos fluorocromos ($5,8 \pm 1,9\%$) tras el tratamiento con NVP-AUY922. Sin embargo, la línea celular **CFPAC-1** tiene un considerable incremento de células positivas para ambos fluorocromos con respecto a su control ($14,3 \pm 5,4\%$), es decir de

células que podrían estar sufriendo un proceso de necrosis o encontrarse en una fase tardía de la apoptosis. Por último, los resultados de estos experimentos indican que el porcentaje de células marcadas solamente con 7-AAD (FITC-/7-AAD+) fue muy pequeño para ambas líneas tras el tratamiento, en concreto de un $0,5 \pm 0,2\%$ para **IMIM-PC-2**, y de un $1,7 \pm 1,4\%$ para **CFPAC-1**, con respecto a sus controles (Figura 66).

Al igual que ocurrió tras el tratamiento con el inhibidor 17-AAG, las células **IMIM-PC-2** tratadas con NVP-AUY922 presentan un alto porcentaje de células en apoptosis temprana en los ensayos realizados con Anexina V, por lo que también se decidió analizar la morfología de los núcleos en células control y tratadas con NVP-AUY922 ($0,1 \mu\text{M}$) durante 24 horas. El conteo de los núcleos indica que hay un mayor número de núcleos con condensación y fragmentación de cromatina en las células tratadas ($1,5\%$), en relación a las células control ($0,1\%$) (Figura 67).

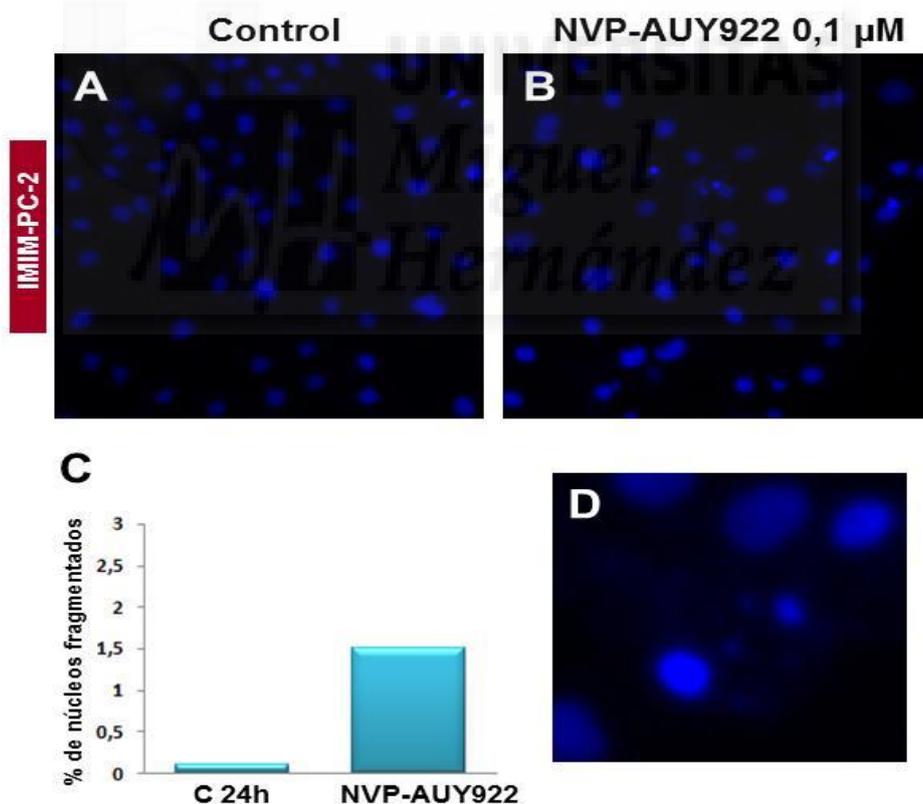


Figura 67: Estudio mediante microscopía de fluorescencia del efecto de NVP-AUY922 sobre la integridad de la cromatina. La línea celular IMIM-PC-2 se cultivó y trató con DMSO (A) o $0,1 \mu\text{M}$ de NVP-AUY922 (B), y posteriormente se incubó con el fluoróforo Hoechst 33342 para el marcaje de la cromatina. El porcentaje de núcleos con fragmentación de cromatina se calculó para ambas condiciones (C). Las imágenes se tomaron mediante microscopía de fluorescencia (objetivo 20X), y un núcleo con condensación y fragmentación de cromatina representativo se ha magnificado (D).

7. Estudio de factores relacionados con la acción antitumoral de 17-AAG

Al iniciar este trabajo, se eligieron dos inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922, de procedencia química diferente, pero con un mecanismo de acción común, para estudiar la respuesta antitumoral que provocaban en modelos celulares de CP y de CCR. Como se ha descrito en apartados anteriores, los diferentes experimentos realizados revelaron que no todas las líneas celulares respondían de igual modo a 17-AAG y NVP-AUY922. De hecho, había algunas líneas que no respondían bien o lo hacían de forma leve al tratamiento con 17-AAG. Por el contrario, todas las líneas estudiadas, inclusive las consideradas resistentes a 17-AAG, eran sensibles al tratamiento con NVP-AUY922. Por tanto, se planteó investigar posibles factores que pueden estar mediando en la resistencia que presentan dichas líneas celulares frente al inhibidor 17-AAG.

7.1 Papel de los transportadores ABC

Teniendo en cuenta otros estudios que relacionaban la resistencia a inhibidores ansamicínicos con los transportadores ABC y el fenotipo MDR [199, 200], se quiso determinar si algunos de estos transportadores estaban involucrados en la resistencia a 17-AAG observada en algunas de líneas celulares estudiadas. Para ello, se analizaron los niveles de expresión en condiciones de crecimiento normales de algunos transportadores ABC, en concreto de Mdr-1, MRP1 y BCRP1, en todas las líneas celulares de CP y de CCR, incluidas en nuestro trabajo. Los resultados obtenidos indicaron que ninguna de las líneas celulares de CP expresan el transportador Mdr-1 (P-gp) (Figura 68).

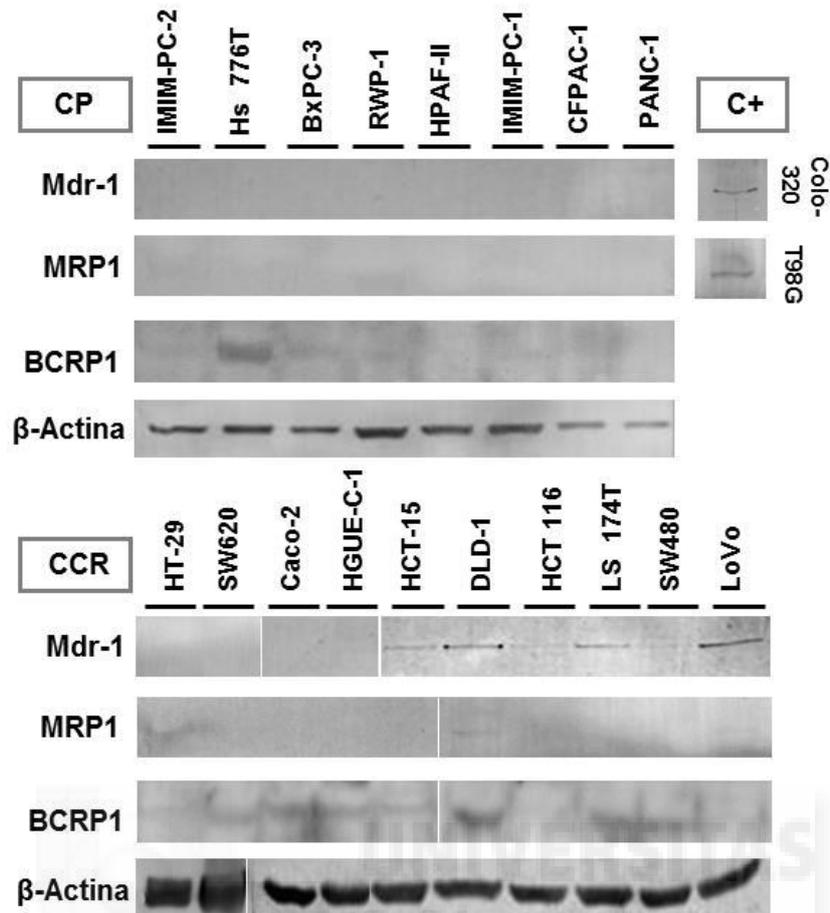


Figura 68: Niveles de expresión de los transportadores ABC. Los niveles de expresión de Mdr-1, MRP1 y BCRP1 se determinaron mediante Western blot en extractos de líneas de CP y de CCR crecidas en condiciones normales. La imagen corresponde a experimentos representativos. Las líneas celulares Colo 320 y T98G se utilizaron como controles positivos para Mdr-1 y MRP1, respectivamente. Para la detección se usaron anticuerpos frente a Mdr-1, MRP1 y BCRP1. β-actina fue utilizada como control de carga para todas las condiciones.

Por el contrario, varias de las líneas celulares de CCR, en concreto **HCT-15**, **LoVo**, **DLD-1** y **LS 174T** expresan niveles de Mdr-1 (Figuras 68 y 69). Con respecto a MRP1, solamente la línea **DLD-1** presenta niveles de expresión de este transportador (Figuras 68 y 69). Por último, la expresión del transportador BCRP1 se detecta en bastantes líneas celulares, siendo su expresión bastante significativa en la línea celular de CP **Hs 776T** (Figuras 68 y 69), y en menor medida, en las líneas celulares de CCR **SW480**, **SW620**, **DLD-1**, **HCT-15**, **HGUE-CC-1**, **LS 174T** y **Caco-2** (Figuras 68 y 69).

Resultados

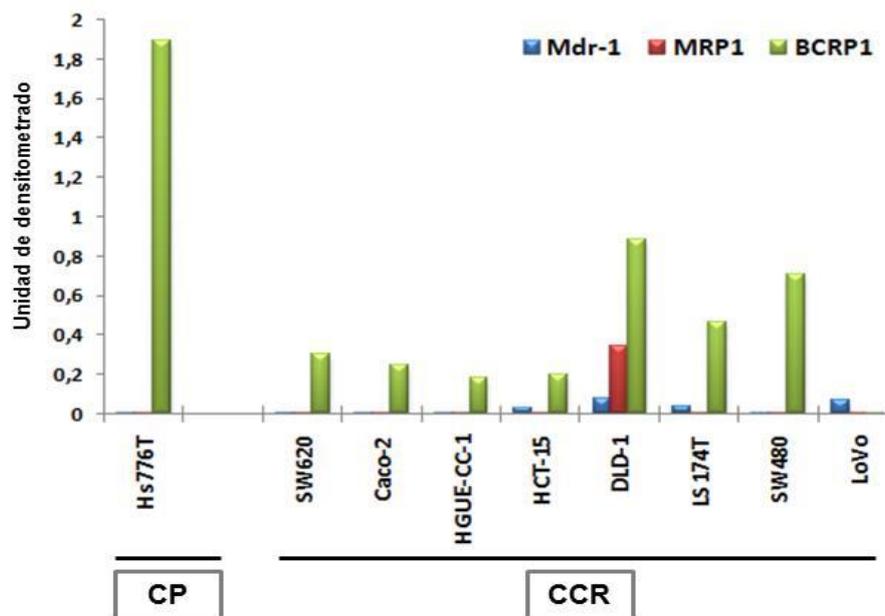


Figura 69: Densitometrado de los niveles de los transportadores ABC. El gráfico de barras muestra el nivel de expresión de Mdr-1, MRP1 y BCRP1 en las líneas celulares representadas en la figura anterior normalizadas con β -actina.

Sin embargo, y a pesar de que los experimentos muestran que varias líneas celulares tienen niveles de expresión de transportadores relacionados con el fenómeno MDR, no se detectó ninguno de estos transportadores en las líneas celulares de CP resistentes al tratamiento con 17-AAG **CFPAC-1** y **PANC-1**. Por otro lado, la línea celular de CCR **Caco-2** resistente a 17-AAG expresa niveles reducidos del transportador BCRP1, y la línea **LoVo**, que tiene una sensibilidad intermedia a 17-AAG, expresa niveles de Mdr-1 muy leves (Figura 69). Aun así, la expresión de BCRP1 y Mdr-1 no parece tener relación con la resistencia al tratamiento con 17-AAG, dado que otras líneas celulares con mayor expresión para estos transportadores responden a 17-AAG, como es caso de las líneas celulares de CCR **SW620** o **LS 174T**, o la línea celular de CP **Hs 776T** (Figuras 29 y 30). La única línea celular incluida en este estudio que expresa niveles de los tres transportadores ABC es **DLD-1**, que responde al tratamiento con 17-AAG (Figura 68 y 69).

7.2 Papel de la enzima NQO1

La enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1, DT-diaforasa) puede metabolizar al inhibidor 17-AAG, reduciéndolo desde su forma quinona (17-AAG) a una forma hidroquinona (17-AAGH₂). Este metabolito reducido es más eficaz que 17-AAG, ya que tiene una mayor afinidad por HSP90 [195, 196]. Por tanto, la presencia o no de

esta enzima en las líneas celulares puede influir en el efecto citotóxico de este inhibidor. Para averiguar si esta enzima interviene en el efecto producido por 17-AAG en las células utilizadas en este estudio, y si está relacionada con la escasa respuesta a 17-AAG que presentan algunas de ellas, se realizaron varios experimentos que se describen a continuación.

7.2.1 Estudio de la expresión y la actividad enzimática de NQO1

Inicialmente, para confirmar si las líneas celulares de CP y de CCR disponían de NQO1 se analizaron los niveles de expresión de NQO1 en extractos de las líneas celulares incluidas en este estudio, y además en varios cultivos primarios (Figura 70).

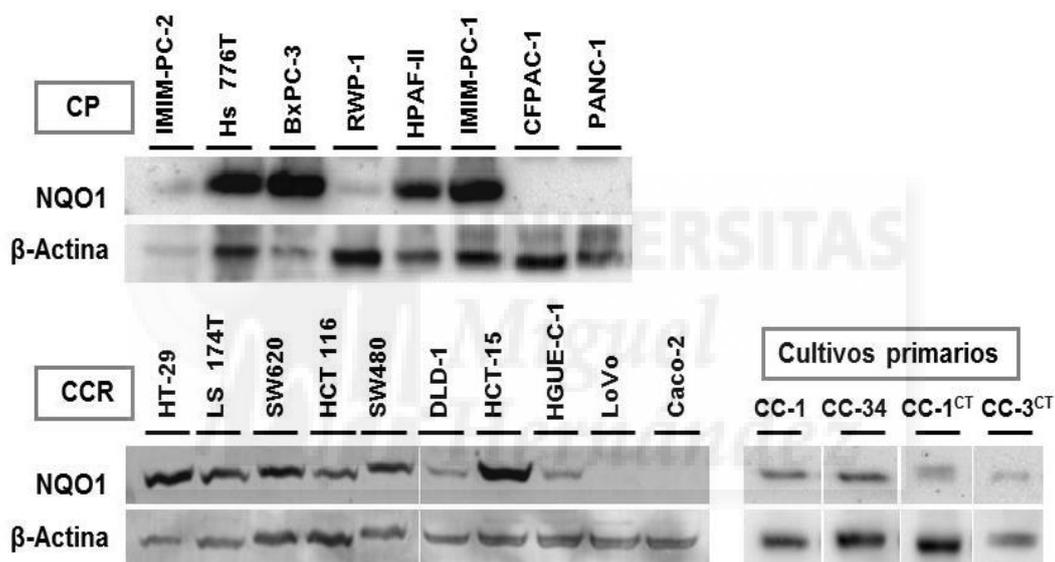


Figura 70: Niveles de expresión de la enzima NQO1. Los niveles de expresión de NQO1 se determinaron mediante Western blot en extractos de las líneas celulares de CP y de CCR, y de cultivos primarios (HCUVA-CC-1 (CC-1), HCUVA-CC-34 (CC-34), HCUVA-C-1^{CT} (CC-1^{CT}), HCUVA-CC-3^{CT} (CC-3^{CT})), cultivados en condiciones normales. La imagen corresponde a experimentos representativos. Para la detección se usó un anticuerpo frente NQO1 y β -actina fue utilizada como control de carga.

Estos experimentos muestran que dos de las líneas celulares de CP, concretamente **PANC-1** y **CFPAC-1**, no presentan niveles de expresión de NQO1, y en las líneas celulares de CCR ocurre lo mismo con otras dos líneas, **LoVo** y **Caco-2** (Figura 70). El resto de las líneas celulares muestran niveles de NQO1, y los cultivos primarios HCUVA-CC-1, HCUVA-CC-34, HCUVA-CC-1^{CT}, HCUVA-CC-3^{CT} también presentan niveles de la enzima NQO1 (Figura 70).

Resultados

Además de detectar la expresión de NQO1 en dichas células, también se estudió si correspondía con una NQO1 funcional. Esto es importante ya que existen dos polimorfismos no funcionales de NQO1 (NQO1*2 y NQO1*3). El polimorfismo NQO1*2 cuando está presente de forma homocigota conllevan la pérdida de la proteína y de la actividad enzimática de NQO1, y el polimorfismo NQO1*3 puede tener una actividad enzimática disminuida para determinados sustratos [265]. Para analizar si NQO1 era funcional, se investigaron los niveles de actividad enzimática de NQO1 en algunas líneas celulares. En concreto, se analizaron cuatro líneas sensibles a 17-AAG: **IMIM-PC-2**, **IMIM-PC-1**, **HT-29** y **SW620**, una de sensibilidad intermedia: **LoVo** y tres líneas resistentes: **CFPAC-1**, **PANC-1**, y **Caco-2** (Tabla 30).

nº	Línea celular	IC ₅₀ 17-AAG	IC ₅₀ NVP-AUY922	Actividad NQO1	con ES 936 ^
1	IMIM-PC-1	0,031	0,002	241,2 ± 40,8	20,18 ± 10,1*
2	IMIM-PC-2	0,089	0,012	85,9 ± 14,7	ND*
3	CFPAC-1	> 2,0	0,009	ND	ND
4	PANC-1	> 2,0	0,010	ND	ND
5	HT-29	0,006	0,016	465,1 ± 74,2	92,65 ± 46,2*
6	SW620	0,018	0,003	599,9 ± 87,7	199,71 ± 24,5*
7	LoVo	0,738	0,033	8,87 ± 2,3	ND
8	Caco-2	1,095	0,024	ND	ND

Tabla 30: Actividad de NQO1 en las líneas celulares de CP y CCR. La actividad específica de NQO1 (nmol DCPIP / min/mg de proteína) se calculó utilizando el ensayo de reducción de DCPIP en presencia/ausencia de dicumarol en extractos de las ocho líneas indicadas. Se indican los valores de concentración para el 50% de inhibición del crecimiento (IC₅₀) de cada línea y para cada inhibidor calculados en el apartado 2.1. También se determinó la inhibición de la actividad de NQO1 por el compuesto ES 936. ^ Las células fueron tratadas con 0,1 µM de ES 936 durante 30 min, y posteriormente se analizó la actividad de NQO1. La media de al menos tres experimentos fue representada ± SEM. La reducción de NQO1 tras el tratamiento con ES 936 es estadísticamente significativa (*p <0,05) y fue calculada con el test de Mann-Whitney. ND: actividad de NQO1 no detectable (<5 nmol DCPIP / min / mg de proteína).

Consistente con los resultados obtenidos mediante Western blot, las líneas que carecen de expresión de NQO1, tampoco tienen actividad enzimática de NQO1, excepto la línea **LoVo**, que presenta unos niveles casi inapreciables de actividad enzimática (8,87 ± 2,3). En el caso de las líneas **PANC-1** y **Caco-2**, otros trabajos han revelado que no es detectable ni la expresión ni la actividad de NQO1 en ellas porque presentan el

polimorfismo NQO1*2 homocigoto [265, 266]. Por otro lado, el resto de las líneas celulares analizadas que si presentan expresión de NQO1, también tienen actividad enzimática, por lo que la funcionalidad de la enzima pudo ser confirmada en estas células (Tabla 30).

Teniendo en cuenta estos resultados, se utilizó un test de correlación para elucidar si la actividad enzimática de NQO1 y la sensibilidad a 17-AAG en las células analizadas estaban directamente relacionadas. El parámetro estadístico utilizado para medir esta relación fue el coeficiente de correlación de Spearman, y este parámetro indica que existe una correlación negativa estadísticamente significativa ($r = -0,9271$, $p = 0,0022$) entre la actividad enzimática de NQO1 y los valores de IC_{50} para 17-AAG (Figura 71, A). De igual modo, este coeficiente también fue calculado para NVP-AUY922, para explorar la posibilidad de una asociación entre NQO1 y la sensibilidad de las líneas celulares a este inhibidor. Sin embargo, en este caso, el coeficiente obtenido ($r = -0,3904$, $p = 0,3268$) señala que no existe una relación estadísticamente significativa entre ambos (Figura 71, B).

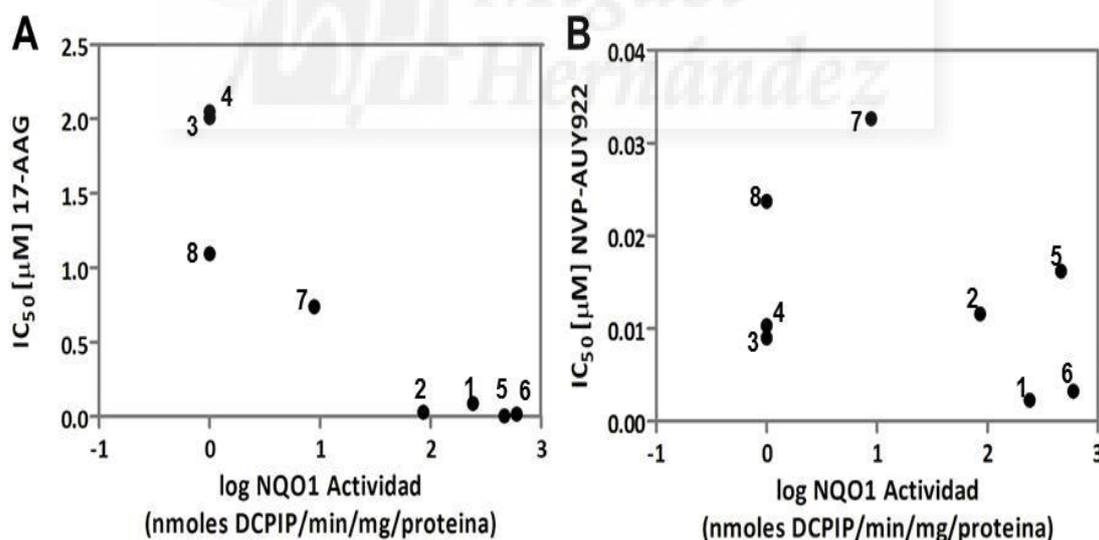


Figura 71: Relación entre la IC_{50} de 17-AAG y NVP-AUY922 con la actividad enzimática de NQO1. Los valores del 50% de inhibición del crecimiento (IC_{50}) después de 72 horas de tratamiento con 17-AAG (A) y con NVP-AUY922 (B) se representaron frente a la actividad NQO1 (nmol DCPIP / min / mg de proteína) y se calculó el test de correlación de Spearman. Cada número corresponde a la línea celular indicada en la Tabla 30.

7.2.2 Inhibición farmacológica de NQO1

Para determinar si la presencia de la enzima NQO1 puede influir en la actividad antitumoral de 17-AAG, se decidió utilizar un inhibidor específico de esta enzima, como ES 936. Dicho compuesto es capaz de inhibir el 95% de la actividad de NQO1 en 30 minutos a concentraciones no tóxicas para las células (0,1 μ M), pero no inhibe la actividad de otras reductasas celulares [256], por lo que es un buen candidato para estudiar la importancia y participación de esta enzima en la actividad de 17-AAG en las líneas celulares. Para ello, las cuatro líneas celulares analizadas que tenían actividad enzimática de NQO1 se trataron con ES 936 durante 30 minutos y la actividad de NQO1 se calculó trascurrido este tiempo (Tabla 30). Tras el tratamiento con ES 936, la línea celular con menor actividad de NQO1, **IMIM-PC-2**, perdió totalmente la actividad de NQO1, y en la línea **IMIM-PC-1**, ES 936 fue capaz de inhibir más del 90% de la actividad de NQO1. Las dos líneas celulares de CCR, **HT-29** y **SW620**, tras 30 minutos de tratamiento con ES 936, presentaban un 20-30% de actividad de NQO1.

Atendiendo a estos resultados, las líneas celulares donde ES 936 fue más efectivo (**IMIM-PC-2** e **IMIM-PC-1**), se trataron con este fármaco y tras ello fueron tratadas con 17-AAG, para valorar los efectos de 17-AAG en ausencia de actividad de NQO1, y se compararon estos efectos con los provocados en células solamente tratadas con 17-AAG. Estos experimentos indican que la inhibición del crecimiento en células tratadas únicamente con 17-AAG fue muy similar a la que se produce en células tratadas con ES 936 previamente (30 min) y durante todo el ensayo (72 horas), (Figura 72). Por tanto, la inhibición de NQO1 producida por el fármaco ES 936 no variaba la disminución del crecimiento celular producido por 17-AAG sobre estas líneas celulares y en estas condiciones experimentales. Este resultado apunta la posibilidad de que la actividad de NQO1 no sea indispensable para que 17-AAG pueda ejercer un efecto antiproliferativo sobre algunas células tumorales.

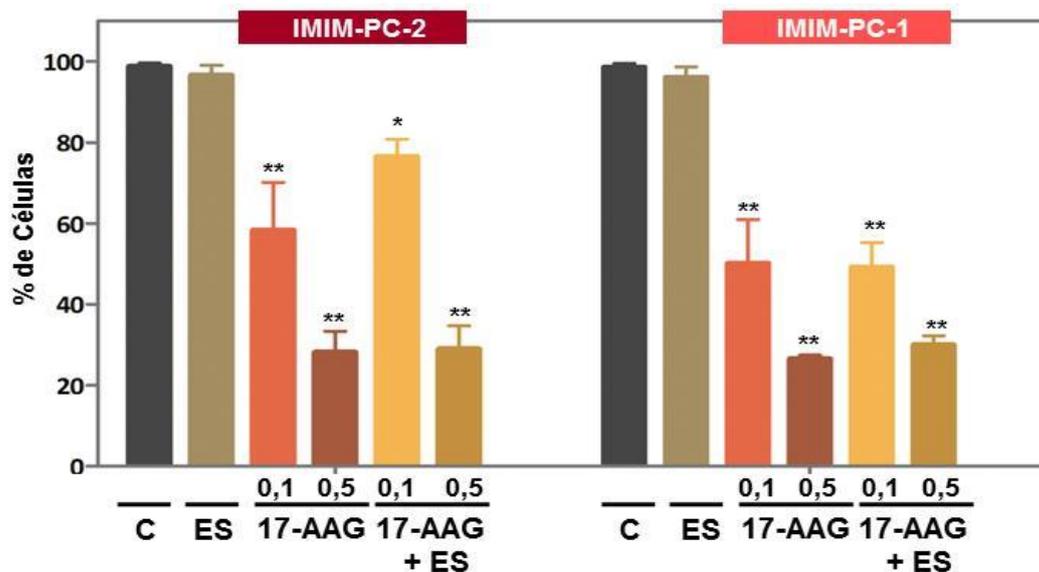


Figura 72: Inhibición de la proliferación producida por 17-AAG y ES 936. Las líneas de CP IMIM-PC-2 e IMIM-PC-1 se trataron con DMSO (C), ES 936 (0,1 μ M), 17-AAG (0,1 o 0,5 μ M) o 17-AAG (0,1 o 0,5 μ M) junto con ES 936 (0,1 μ M) durante 72 horas. Las células tratadas con ES 936 (ES y 17-AAG + ES) se trataron previamente con 0,1 μ M de ES 936 durante 30 minutos. La proliferación celular se determinó mediante tinción con cristal violeta. Cada barra representa el promedio de al menos tres experimentos \pm SEM. Las diferencias significativas de las células tratadas solamente con 17-AAG o en combinación con ES 936 con respecto al control (C) se determinaron mediante el test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Asimismo, quisimos determinar los efectos de la inhibición farmacológica de NQO1 con el inhibidor específico ES 936 en ensayos a largo plazo de tiempo como son los ensayos de clonogenicidad. Para ello, las células de CCR, **HT-29**, fueron expuestas a 17-AAG en un corto periodo de tiempo, solamente 4 horas, y después se dejaron crecer durante 14 días. En una de las condiciones y antes del tratamiento con 17-AAG, las células fueron previamente tratadas con ES 936 para inhibir la actividad de NQO1, y además, el fármaco ES 936 se añadió junto con 17-AAG durante todo el tiempo que las células fueron tratadas (4 horas). Además, se comprobó que al cabo de cuatro horas de tratamiento con 17-AAG, la actividad de NQO1 permanecía inhibida en la línea celular **HT-29** (Tabla 31).

El ensayo de clonogenicidad determinó que las células **HT-29** no son capaces de recuperarse de la exposición a 17-AAG (0,5 μ M) durante 4 horas, y que solamente un $19,7 \pm 8,9\%$ sobrevive tras el tratamiento con este fármaco (Figura 73). Por otro lado, cuando las células **HT-29** fueron tratadas con ambos inhibidores, 17-AAG y ES 936, un mayor número de células consigue sobrevivir, aproximadamente la mitad de la

Resultados

población celular ($52,6 \pm 2,7\%$) (Figura 73), aunque el resto de las células mueren a consecuencia del tratamiento con 17-AAG. Este resultado indica que, aunque las células no dispongan de actividad enzimática de NQO1, 17-AAG pudo disminuir alrededor de la mitad de las células, por lo que tiene acción antiproliferativa.

Actividad NQO1		
Línea celular	Control	con ES 936 4 h
HT-29	488.0 ± 49.1	ND

Tabla 31: Actividad de NQO1 tras 4 horas de tratamiento con ES 936. La actividad específica de NQO1 (nmol DCPIP / min / mg de proteína) se calculó utilizando el ensayo de reducción de DCPIP en presencia/ausencia de dicumarol en extractos de la línea de CCR HT-29 tratados con DMSO (control) o con $0,1 \mu\text{M}$ de ES 936 durante 4 horas. La media de al menos tres experimentos es representada \pm SEM. ND: actividad de NQO1 no detectable ($<5 \text{ nmol DCPIP / min / mg de proteína}$).

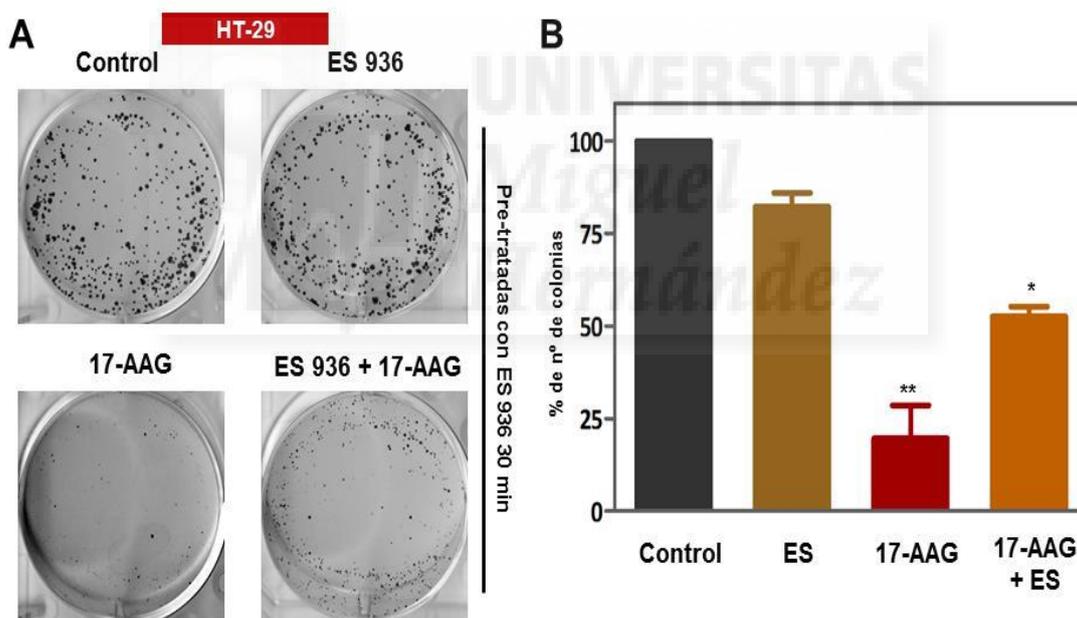


Figura 73: Inhibición de la formación de colonias producida por 17-AAG y ES 936 en ensayos de clonogenicidad. Las células HT-29 fueron sembradas a baja densidad y cultivadas durante 24 horas. A continuación, las células fueron tratadas con DMSO (Control), $0,1 \mu\text{M}$ de ES 936 (ES), $0,5 \mu\text{M}$ 17-AAG, o $0,5 \mu\text{M}$ 17-AAG junto con $0,1 \mu\text{M}$ ES 936 (17-AAG + ES) durante 4 horas. Las células tratadas con ES 936 (ES y 17-AAG + ES) fueron previamente incubadas con $0,1 \mu\text{M}$ ES 936 durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las células se lavaron y se dejaron crecer durante 14 días, tras los cuales las colonias formadas se fijaron, tiñeron y contaron. La imagen escaneada es representativa de las colonias formadas en cada condición (A). El gráfico representa el porcentaje de colonias normalizado de al menos tres experimentos \pm SEM. (B) Las diferencias significativas de las células tratadas con 17-AAG y en combinación con ES 936 (17-AAG + ES) con respecto al control se determinaron mediante el test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

7.2.3 Inhibición biológica de NQO1

Atendiendo a los resultados obtenidos tras la inhibición de la actividad enzimática de NQO1 con ES 936, nos planteamos estudiar si esta enzima estaba influyendo en la actividad producida por 17-AAG con otro tipo de ensayos. Para ello, se decidió silenciar la expresión génica de NQO1 en la línea celular de CP **IMIM-PC-2** mediante ARN de interferencia (ARNi). La realización de este experimento está descrita con detalle en Materiales y Métodos, pero queremos recordar que para cerciorarnos de que el silenciamiento se estaba produciendo durante todo el tiempo que duró el tratamiento con 17-AAG (72 horas), se realizaron dos ensayos complementarios. En concreto, se recogieron extractos celulares de todas las condiciones transcurridas 72 horas, y se determinaron los niveles de expresión de NQO1 (Figura 74) y su actividad enzimática en todas ellas (Tabla 32). Además, también se utilizó una secuencia inespecífica de ARNi (ARNi “scramble” (S)) para comprobar que los resultados de dichos experimentos eran debidos específicamente al silenciamiento de NQO1, y no a procesos inespecíficos asociados al proceso de la transfección. Inicialmente, se analizaron los niveles de expresión de NQO1, y se observa que el ARNi específico para NQO1 (ARNi NQO1) provocaba en las células una disminución, hasta niveles inapreciables, de la expresión de la enzima NQO1 (Figura 74, A). Al mismo tiempo, se analizaron los niveles del receptor EGFR, proteína cliente de HSP90, y los niveles de HSP70, cuyo aumento es indicativo de la inhibición de HSP90. Los resultados de los experimentos muestran que los niveles de expresión de ambas proteínas se modifican solamente en las células que fueron tratadas con 17-AAG, por lo que la transfección no influyó en la actividad de la chaperona HSP90, ni en el mecanismo de acción de 17-AAG, que fue capaz de eliminar la expresión de EGFR y aumentar los niveles de HSP70, aún en ausencia de NQO1. También se analizó la actividad enzimática de NQO1, y no se detectó actividad alguna en las células transfectadas con ARNi NQO1, pero sí en las células control o en las transfectadas con la secuencia inespecífica (Figura 74, B, Tabla 32). Ambos experimentos nos sirvieron para validar que los experimentos transcurrieron en ausencia de expresión y actividad de NQO1.

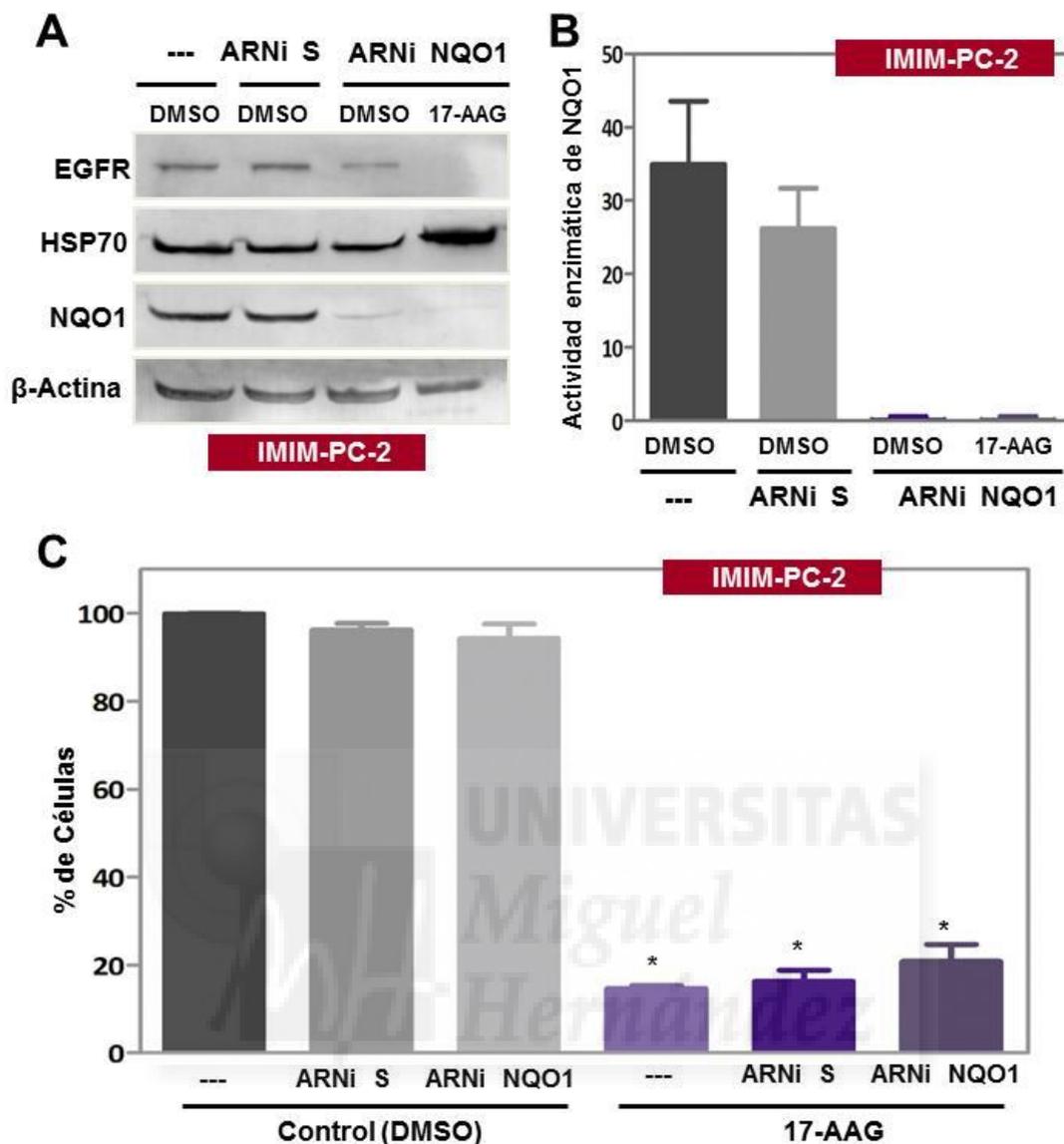


Figura 74: Inhibición biológica de la enzima NQO1. La línea de CP IMIM-PC-2 fue no transfectada (Control) o transfectada con ARNi scramble (ARNi S) o con ARNi específico para silenciar NQO1 (ARNi NQO1) durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con DMSO (control) o 0,5 μ M de 17-AAG durante 72 horas. A continuación, se realizaron los siguientes experimentos. A) Los niveles de expresión de EGFR, HSP70 y NQO1 se determinaron mediante Western blot en los extractos de las condiciones indicadas. La imagen corresponde a experimentos representativos. Para la detección se usaron anticuerpos frente a EGFR, HSP70 y NQO1, y β -actina fue utilizada como control de carga para todas las condiciones. B) La actividad específica de NQO1 (nmol DCPIP / min/ mg de proteína) se calculó utilizando el ensayo de reducción de DCPIP en presencia/ausencia de dicumarol en los extractos de las condiciones indicadas. C) La proliferación celular fue determinada mediante tinción con cristal violeta. Cada barra representa el promedio de al menos tres experimentos \pm SEM y las diferencias significativas de los tratamientos con respecto a su control se determinaron mediante el test de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

Finalmente, se analizaron los efectos antiproliferativos producidos por el tratamiento de 17-AAG (0,5 μ M) durante 72 horas tanto en células transfectadas como

en no transfectadas, y los resultados de los experimentos determinan que 17-AAG fue capaz de disminuir el crecimiento en las células donde NQO1 se había silenciado y en las células en las que no (Figura 74, C), poniendo de manifiesto que la reducción de 17-AAG a su forma hidroquinona (17-AAGH₂) mediada por NQO1, no es necesaria para que este fármaco pueda ejercer un efecto citotóxico sobre la línea celular **IMIM-PC-2**.

Línea celular	Actividad NQO1			
	Control	ARNi S	ARNi NQO1 + DMSO	ARNi NQO1 + 17-AAG
IMIM-PC-2	34.9 ± 8.6	26.2 ± 5.5	ND	ND

Tabla 32: Actividad de NQO1 tras el silenciamiento biológico de NQO1. La actividad específica de NQO1 (nmol DCPIP / min / mg de proteína) se calculó utilizando el ensayo de reducción de DCPIP en presencia/ausencia de dicumarol en extractos de las células IMIM-PC-2 no transfectadas (Control), o transfectadas con ARNi *scramble* (ARNi S), o con ARNi específico para silenciar NQO1 (ARNi NQO1) durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con DMSO en las condiciones: control, ARNi S y ARNi NQO1, o con 0,5 µM de 17-AAG en una condición ARNi NQO1, durante 72 horas. El promedio de al menos tres experimentos fue representado ± SEM. ND: actividad de NQO1 no detectable (<5 nmol DCPIP / min / mg de proteína).

8. Estudio de la combinación del inhibidor NVP-AUY922 con otros fármacos antitumorales

Dado que los inhibidores de HSP90, y en concreto NVP-AUY922, mostraron ser eficaces en nuestros modelos celulares *in vitro* de CP y de CCR, pensamos que podría ser interesante estudiar el efecto de la combinación este inhibidor con fármacos que ya se utilizan en el tratamiento del CP y del CCR, e incluso con otros fármacos que están siendo evaluados en ensayos clínicos, al igual que ocurre con NVP-AUY922, y que en algún momento han formado parte de las investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio. Para valorar los efectos antiproliferativos de la combinación de NVP-AUY922 con otros fármacos, hemos utilizado el modelo teórico Bliss. Este modelo, descrito en Materiales y Métodos, permite estimar si la interacción de dos fármacos conduce a un efecto puramente aditivo, sinérgico o por el contrario, antagónico. En este caso, se decidió combinar con NVP-AUY922 dos fármacos antineoplásicos utilizados en clínica para el tratamiento de pacientes con CP y CCR. Uno de ellos es gemcitabina (GEM) y otro es oxaliplatino (OXA), que actúan impidiendo la correcta síntesis del ADN. Por otro lado, optamos por incorporar al estudio dos fármacos que

Resultados

todavía no han sido aprobados para su uso en clínica, pero que están siendo evaluados en ensayos clínicos para diferentes tipos de tumores, y forman parte de la denominada terapia "dirigida", ya que presentan una diana farmacológica específica. Se trata de un inhibidor potente y selectivo de la proteína Mek 1/2, el fármaco Selumetinib o AZD6244 (AZD) [267], que afecta a la ruta de señalización MAPK, y un compuesto que inhibe la ruta PI3-K/Akt a través de la interacción dual con el sitio de unión de ATP en las proteínas quinasas PI3-K y mTOR, llamado NVP-BEZ235 (BEZ) [268].

De este modo, y sabiendo el potente efecto que produce NVP-AUY922 en todas las líneas celulares incluidas en este estudio, decidimos usar una concentración sub-óptima de NVP-AUY922 (0,01 o 0,005 μM) para ser combinada con concentraciones crecientes de GEM, OXA, AZD o BEZ. Además, para la realización de estos experimentos se eligieron líneas celulares que no responden bien al tratamiento con los fármacos que se combinar con NVP-AUY922, y son consideradas resistentes a ellos, según los ensayos de proliferación previamente realizados en nuestro laboratorio. Las líneas celulares seleccionadas para el estudio de las combinaciones farmacológicas fueron **DLD-1** y **HCT-15**, de CCR, y **PANC-1** y **CFPAC-1**, de CP. En concreto, la línea **HCT-15** no responde al tratamiento con OXA, y la línea **DLD-1**, al nuevo agente AZD. Por otro lado, las líneas celulares de CP **PANC-1** y **CFPAC-1** no responden a GEM, y en el caso de **PANC-1**, tampoco lo hace frente al inhibidor BEZ.

En los ensayos dosis-respuesta se utilizaron cuatro concentraciones crecientes para cada fármaco (OXA, GEM, AZD y BEZ), dentro de diferentes rangos, y las células fueron tratadas en ausencia y presencia de NVP-AUY922 a una concentración de 0,01 μM , o de 0,005 μM en el caso de las células tratadas con AZD. Los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular fueron calculados, y a partir de estos datos se determinó la curva teórica BLISS. La curva BLISS representa los datos de la inhibición del crecimiento celular que se podrían esperar de una combinación aditiva, es decir, de la suma del efecto de ambos fármacos. Pero además de esta curva, también se representó la curva experimental (EXP), que muestra la inhibición real de la proliferación obtenida en los experimentos tras la combinación, y la curva del efecto antiproliferativo del fármaco (OXA, GEM, AZD y BEZ) como agente único. Como se observa en la figura 75, para todas las líneas celulares estudiadas, la combinación de NVP-AUY922 con los cuatro fármacos

estudiados produce un efecto sinérgico, dado que los valores de inhibición del crecimiento experimentales (EXP) son superiores a los valores teóricamente esperados (BLISS). De hecho, en algunos casos se produce una inhibición de la proliferación muy superior tras la combinación farmacológica, que cuando el fármaco actúa solo. Este es el caso de la línea celular **DLD-1** al ser tratadas con AZD y NVP-AUY922 (Figura 75, D), en las que la combinación de ambos fármacos produce una disminución del crecimiento celular de $62,6 \pm 1,3\%$ a la concentración de AZD más alta utilizada ($1 \mu\text{M}$), en comparación al $37,5\%$ que produce el fármaco AZD cuando se utiliza como agente único a esta misma concentración (Tabla 33).

GEM [μM]	PANC-1		GEM [μM]	CFPAC-1		OXA [μM]	HCT-15	
	BLISS	EXP		BLISS	EXP		BLISS	EXP
0,01	16,4	$26,2 \pm 0,8$	0,01	33,4	$31,6 \pm 2,3$	0,1	34,5	$46,2 \pm 5,7$
0,1	15,7	$31,8 \pm 3,3$	0,1	32,3	$47,4 \pm 5,4$	0,5	36,1	$48,4 \pm 4,2$
0,5	24,3	$52,0 \pm 7,9$	0,5	38,9	$61,8 \pm 1,3$	1	40,8	$53,6 \pm 3,9$
1	42	$57,5 \pm 5,9$	1	47,9	$63,2 \pm 1,2$	5	54,5	$68,1 \pm 1,9$
AZD [μM]	DLD-1		BEZ [μM]	PANC-1				
	BLISS	EXP		BLISS	EXP			
0,01	16,0	$32,7 \pm 1,6$	0,001	7,6	$24,8 \pm 0,9$			
0,1	29,0	$39,2 \pm 3,1$	0,01	13,6	$35,2 \pm 6,6$			
0,5	34,5	$53,4 \pm 0,4$	0,05	27,3	$43,0 \pm 4,9$			
1	37,5	$62,6 \pm 1,3$	0,1	36,5	$45,3 \pm 2,3$			

Tabla 33: Porcentaje de inhibición de la proliferación tras el tratamiento de NVP-AUY922 en combinación con otros fármacos. El fármaco NVP-AUY922 fue combinado con gemcitabina (GEM), oxaliplatino (OXA), AZD6244 (AZD) y NVP-BE2235 (BEZ) en las concentraciones indicadas en la tabla, y los porcentajes de inhibición de la proliferación celular con respecto al control (100%) fueron calculados para cada uno de ellos. La primera columna para cada línea representa el % de inhibición calculado teóricamente (BLISS), y la segunda columna representa el % de inhibición observado (EXP) a 72 horas.

Las líneas celulares **PANC-1** y **CFPAC-1** (Figura 75, A y B) también se beneficiaron de la combinación de NVP-AUY922 con el agente quimioterapéutico GEM, utilizado precisamente para el tratamiento del CP, con aproximadamente una diferencia de un 15% de inhibición entre lo esperado (BLISS) y lo que realmente ocurre en los experimentos (EXP), en ambos casos (Tabla 33). Por otro lado, la línea celular **HCT-15** (Figura 75, C) experimenta un incremento de un 13,6% de la inhibición de la

Resultados

proliferación tras el tratamiento con 5 μM de OXA y 0,01 μM de NVP-AUY922, y en la línea celular **PANC-1** (Figura 75, E) la reducción de la proliferación se incrementa un 15,7% con el tratamiento con 0,05 μM de BEZ y 0,01 μM de NVP-AUY922, y un 8,8% con el tratamiento con 0,1 μM de BEZ y 0,01 μM de NVP-AUY922 (Tabla 33).

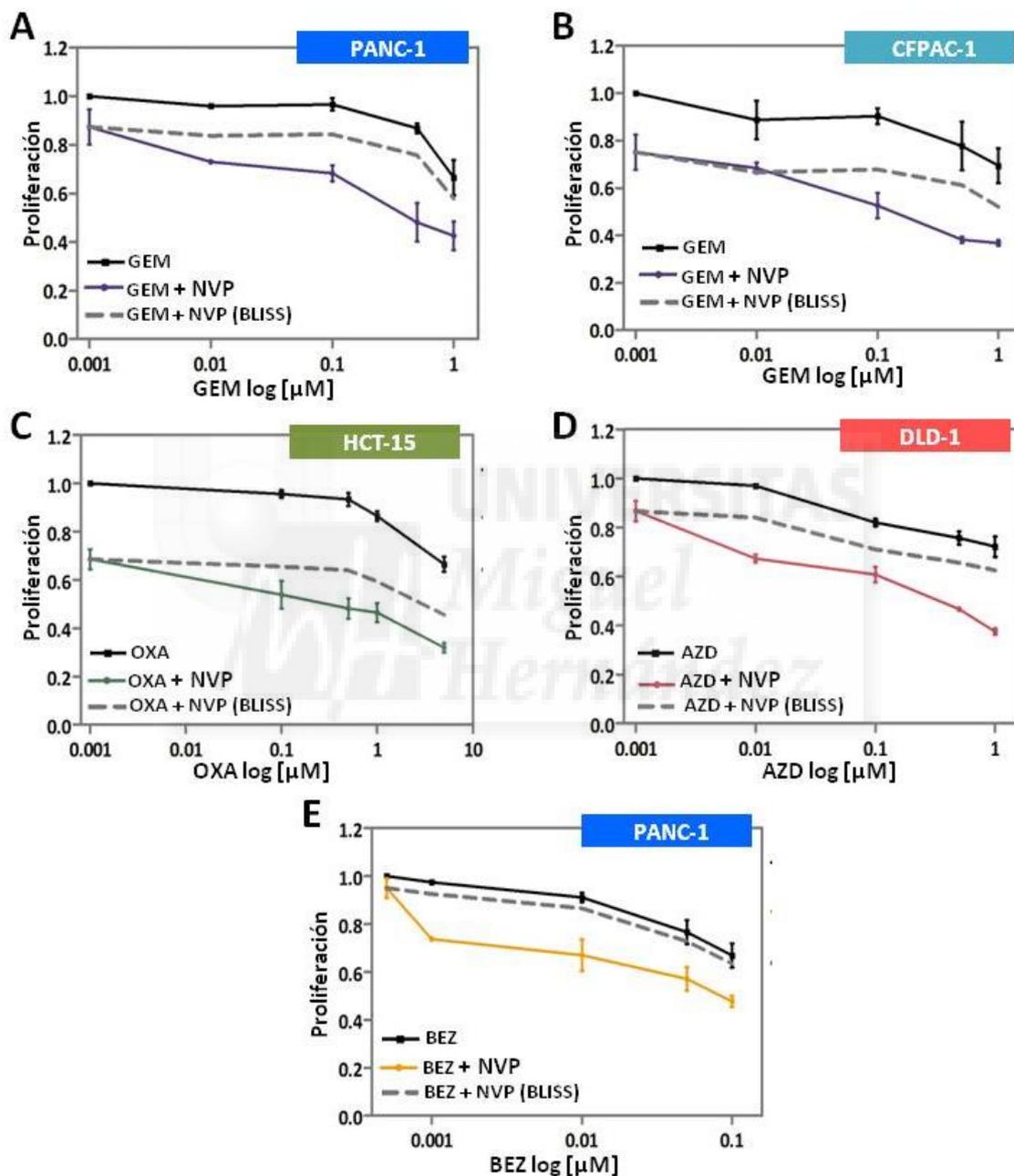


Figura 75: Efectos combinatorios de NVP-AUY922 con otros fármacos. Las líneas celulares de CP (A) CFPAC-1 y (B) PANC-1 se trataron con diferentes concentraciones de GEM (0,01, 0,1, 0,5 y 1 μM) en ausencia o presencia de 0,01 μM NVP-AUY922 durante 72 horas. Las curvas de disminución de proliferación para GEM solo, o con NVP-AUY922, más la curva teórica (BLISS) son representadas. (C) La línea celular de CCR HCT-15 fue tratada con varias concentraciones de OXA (0,1, 0,5, 1 y 5 μM) en ausencia o presencia de 0,01 μM NVP-AUY922 durante 72 horas. Las curvas de disminución de proliferación para OXA

solo, o con NVP-AY922, más la curva teórica (BLISS) son representadas. (D) La línea celular de CCR DLD-1 fue tratada con concentraciones variables de AZD (0,01, 0,1, 0,5 y 1 μM) en ausencia o presencia de 0,005 μM NVP-AUY922 durante 72 horas. Las curvas de disminución de proliferación para AZD solo, o con NVP-AY922, más la curva teórica (BLISS) son representadas. (E) Las células PANC-1 fueron tratadas con diferentes concentraciones de BEZ (0,001, 0,01, 0,05 y 0,1 μM) en ausencia o presencia de 0,01 μM NVP-AUY922 durante 72 horas. Las curvas de disminución de proliferación para BEZ solo, o con NVP-AY922, más la curva teórica (BLISS) son representadas. La proliferación celular en todas las condiciones fue determinada mediante tinción con cristal violeta. En todos los gráficos los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos independientes \pm SEM. La curva teórica (BLISS) fue calculada a partir del promedio para cada punto de la curva.





Discusión

La búsqueda de nuevas moléculas capaces de combatir el cáncer de forma eficaz y segura para los pacientes es hoy en día la base de numerosas investigaciones debido al grave problema sanitario que representa esta enfermedad a nivel mundial. En nuestro estudio hemos querido profundizar en las implicaciones de la inhibición de una chaperona que se encuentra presente de manera constitutiva en todas las células llamada HSP90, la cual participa y es necesaria para la correcta maduración post-traducciona de numerosas proteínas ("clientes") implicadas en procesos vitales para la célula, como la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular [108]. Además, es una chaperona que responde en situaciones estresantes para la célula, ejerciendo un efecto protector sobre las mismas [69].

Las células tumorales dependen del correcto funcionamiento de numerosas oncoproteínas para su supervivencia, y además, lo tienen que hacer en el ambiente desequilibrado que generan los tumores por la falta de nutrientes, oxígeno, etc. Las chaperonas, y entre ellas HSP90, colaboran con las células tumorales en su adaptación a los desórdenes a los que se enfrentan. Es por ello, que la inhibición de HSP90 puede ser una oportunidad de combatir el cáncer, impidiendo que esta chaperona ayude en la maduración y estabilización de oncoproteínas, y en la restauración de la homeostasis celular [97]. El planteamiento de la chaperona HSP90 como una nueva diana farmacológica inicialmente se descartó, ya que es una chaperona esencial para la vida en la célula por la multitud de proteínas que dependen de su actividad para completar su activación. Sin embargo, y a pesar de no parecer una diana adecuada, algunos resultados mostraron que la HSP90 es utilizada de manera diferente por las células tumorales. Estas células suelen tener inducida la expresión de HSP90, una HSP90 más activa, e incluso localizada en lugares diferentes, en comparación a la HSP90 de células no tumorales [117]. De hecho, el uso de los inhibidores de HSP90 como nueva estrategia para abordar la lucha contra el cáncer ha surgido en las dos últimas décadas como una prometedora forma de terapia dirigida, y muchos de estos inhibidores están siendo evaluados en ensayos clínicos. Los inhibidores de HSP90, en general, impiden la unión de ATP a HSP90, por lo que imposibilitan su cambio conformacional y su actividad [71, 108]. En este trabajo, dos inhibidores de HSP90 han sido analizados en profundidad. Dichos fármacos son de diferente origen, uno es un derivado semi-

sintético ansamicínico llamado 17-AAG, y el otro es un derivado sintético basado en el resorcinol, denominado NVP-AUY922.

Ambos inhibidores han sido estudiados por nuestro grupo en dos modelos tumorales *in vitro* de CP y de CCR. El CP es uno de los tumores más malignos y con peor pronóstico que existe en el mundo, que carece de una terapia realmente eficaz para tratarlo, o para aumentar la supervivencia de los pacientes que lo padecen. En el caso de CCR, no es un tumor tan agresivo como el CP y su pronóstico en estadios tempranos de la enfermedad es notablemente mejor, pero aun así es un cáncer a tener muy en cuenta por su alta frecuencia en la población, y por el alto grado de casos con recurrencias tras el tratamiento quirúrgico en los estadios II y III de la enfermedad. Además, en ambos se producen casos de resistencia a las terapias comúnmente utilizadas en clínica. Por otro lado, cabe destacar que HSP90 puede encontrarse sobreexpresada en diferentes tipos de tumores, entre los que se encuentran el CP y el CCR [269, 270].

1. Implicaciones de la inhibición de HSP90 en la proliferación celular

Para iniciar el presente estudio se valoró la eficacia antiproliferativa de los inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922, en dos paneles de líneas celulares de CP y de CCR, realizando ensayos de proliferación con concentraciones crecientes de los inhibidores, que nos permiten calcular la concentración de fármaco necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular *in vitro* (IC_{50}). En primer lugar se evaluó el efecto producido por el inhibidor 17-AAG. El agente 17-AAG ha sido uno de los inhibidores de HSP90 más estudiados, y el primero en ser evaluado en un ensayo clínico como fármaco antitumoral. Es un derivado del antibiótico natural Geldanamicina (GA) y ha demostrado tener efectos antiproliferativos en diferentes tipos tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo* [178-183]. Además, 17-AAG presenta una alta afinidad por la HSP90 expresada en las células tumorales [116]. Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación dependientes de anclaje realizados en nuestro trabajo muestran respuestas diferentes en las células de CP y de CCR frente a este inhibidor. Por un lado, se observa una reducción considerable de la mayoría de las líneas celulares al ser tratadas con 17-AAG (Figura 29 y 30). Por otro lado, hay tres líneas, dos líneas celulares de CP, PANC-1 y CFPAC-1, y una línea celular de CCR, Caco-2, cuya disminución de la proliferación es

menor que en resto de líneas (Figura 29 y 30), y además tienen un valor de IC_{50} superior a $1 \mu M$ (Tabla 16 y 17). El resto de las células, presentan una IC_{50} inferior a $1 \mu M$. Por tanto, se pueden distinguir dos grupos diferentes según su respuesta a 17-AAG, que los hemos agrupado teniendo como referencia si su valor de IC_{50} es superior o inferior a $1 \mu M$. Según este criterio, hay un grupo de líneas celulares con una IC_{50} inferior a $1 \mu M$ o sensibles a 17-AAG, y otro pequeño grupo con una IC_{50} superior a $1 \mu M$ o resistentes a 17-AAG, compuesto por las líneas celulares CFPAC-1, PANC-1 y Caco-2. En el grupo de las líneas sensibles, hay una línea celular de CCR, LoVo, cuya respuesta a 17-AAG es baja a concentraciones en un rango de $0,001-0,5 \mu M$ de 17-AAG, y más alta a concentraciones superiores, por lo que su sensibilidad a 17-AAG ha sido considerada por nosotros como intermedia. En general, el rango de valores de IC_{50} , en las líneas de CP y CCR estudiadas tras el tratamiento con 17-AAG, va desde $6nM$ hasta más de $2 \mu M$ (Tabla 16 y 17). Este rango es muy amplio, debido al diferente efecto antiproliferativo producido por 17-AAG en estos modelos celulares, ya que hay líneas celulares muy sensibles y otras resistentes a este inhibidor. Los resultados obtenidos en los ensayos independientes de anclaje confirmaron que las tres de líneas celulares, PANC-1, CFPAC-1 y Caco-2 (Figura 37 y 39), no responden al tratamiento con 17-AAG. Sin embargo, el resto de las líneas celulares mostraron una gran sensibilidad a 17-AAG, reduciendo la formación de colonias casi en su totalidad (Figura 37 y 39).

En segundo lugar, se evaluó la capacidad antiproliferativa de otro inhibidor de HSP90, llamado NVP-AUY922, de igual modo que se hizo con 17-AAG. Respecto a NVP-AUY922, hay que destacar que ha sido menos estudiado que 17-AAG, ya que es un inhibidor más reciente; pero aun así varias publicaciones ya han puesto de manifiesto su gran capacidad de frenar la proliferación en varios tipos de tumores en ensayos pre-clínicos [226-230]. Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación de nuestro estudio también indican su potente capacidad de inhibición del crecimiento, tanto en líneas celulares de CP, como en las de CCR (Figura 31 y 32). De hecho, todas las líneas celulares estudiadas presentan valores de IC_{50} muy inferiores a $1 \mu M$, comprendidos entre $2 nM$ y $65 nM$. Este rango oscila en concentraciones nanomolares, muy por debajo de los valores de IC_{50} de algunas líneas celulares al ser expuestas a 17-AAG. Tras el tratamiento de NVP-AUY922 no hemos encontrado ninguna línea celular que no

Discusión

responda o resistente a su efecto. Al igual que nosotros, otros autores no han encontrado ninguna línea celular de CP resistente al tratamiento de NVP-AUY922 [271], ni tampoco en un panel de líneas celulares de cáncer gástrico [272], constatando el gran poder citotóxico de este inhibidor en modelos celulares de CP y de otro tipo de tumores gastrointestinales. Además, y del mismo modo que ocurre en las líneas celulares de nuestro estudio, NVP-AUY922 exhibe una actividad antiproliferativa potente y superior a la producida por 17-AAG [228]. En cuanto a los estudios realizados en pacientes, queremos comentar que NVP-AUY922 está siendo evaluado en varios ensayos clínicos [231] tras los resultados tan prometedores que se han obtenido en los estudios pre-clínicos, aunque todavía no se dispone de muchos resultados publicados al respecto.

Los niveles de expresión de HSP90 también nos pareció un factor a tener en cuenta para valorar la respuesta de las células a los inhibidores de HSP90, ya que es común que las células tumorales con una alta expresión de HSP90 dependan más de su correcta funcionalidad para su supervivencia, y por tanto la inhibición de HSP90 en estas células puede causar efectos más graves, que en otras células. Por otro lado, también es posible que si las células tumorales tienen una alta expresión de HSP90, la capacidad de los inhibidores se vea limitada por la cantidad de HSP90. En relación a esto, estudiamos si los efectos antiproliferativos de 17-AAG y NVP-AUY922 estaban asociados a los niveles de expresión de HSP90 de las líneas celulares incluidas en el estudio. Sin embargo, ni en las líneas celulares de CP, donde los niveles de expresión de HSP90 son variables (Figura 26 y 27), ni en las líneas celulares de CCR que presentan niveles muy similares de expresión (Figura 26 y 28), hemos podido determinar una relación entre las diferencias de sensibilidad al tratamiento y los diferentes niveles de expresión de HSP90. En el caso de NVP-AUY922, todas las líneas responden bien al tratamiento, independientemente de su mayor o menor expresión de HSP90, por lo que podemos constatar que no hay relación entre los niveles de HSP90 de las líneas celulares y su sensibilidad a NVP-AUY922. En el caso de 17-AAG, como hemos comentado anteriormente, hay varias líneas con baja o ninguna respuesta a este inhibidor: PANC-1, CFPAC-1 y Caco-2. Las líneas celulares de CP PANC-1 y CFPAC-1 presentan niveles de expresión de HSP90 superiores a otras líneas celulares sensibles a 17-AAG. A priori, este resultado nos hizo pensar que la mayor expresión de HSP90 en

estas células podría estar vinculada a su escasa respuesta a 17-AAG. Sin embargo, al observar los niveles de expresión de HSP90 del resto de las líneas celulares esta hipótesis fue descartada, ya que otras de líneas celulares de CP con una alta expresión de HSP90, como IMIM-PC-1, Hs 766T o BxPC3, son líneas celulares muy sensibles a 17-AAG en los ensayos de proliferación (Figura 29 y Tabla 16). En las líneas celulares de CCR, la línea resistente a 17-AAG, Caco-2, y la línea LoVo, que responde moderadamente a 17-AAG, también tienen una alta expresión de HSP90 (Figura 26 y 28). Pero aun así, y del mismo modo que ocurre en las líneas celulares de CP, otras líneas celulares de CCR, como HCT-15 o HCT 116, presentan niveles de expresión de HSP90 similares a los expresados por la línea Caco-2, y son sensibles a 17-AAG en los ensayos de proliferación (Figura 30 y Tabla 17). Por tanto, no hemos encontrado una relación directa entre los niveles de expresión de HSP90 y su sensibilidad a los inhibidores 17-AAG y NVP-AUY922 en los paneles de células tumorales de CP o de CCR estudiados.

De forma adicional, se evaluaron los efectos antiproliferativos de 17-AAG y NVP-AUY922 en ensayos de larga duración, en concreto seis días, a una concentración constante de cada fármaco (Figura 35). Los ensayos de proliferación se realizaron en cuatro líneas celulares de CP y cuatro líneas celulares de CCR, y la reducción del crecimiento de las líneas celulares seleccionadas fue calculada tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90. Al analizar los resultados obtenidos, se observa que NVP-AUY922 es el inhibidor con un efecto antiproliferativo más potente (Figura 35, B, Tabla 21), y que todas las líneas celulares, tanto de CP como de CCR, presentan una disminución prácticamente total de su crecimiento tras seis días de tratamiento. Los efectos causados por 17-AAG son diferentes. En este caso, las líneas celulares que no responden frente a 17-AAG en los ensayos dosis-respuesta CFPAC-1, PANC-1 y Caco-2, tampoco lo hacen tras seis días de tratamiento y su proliferación casi no está afectada, presentando solamente una reducción de la proliferación entre un 10-20% (Figura 35, A, Tabla 21). Estos resultados nos confirman la escasa respuesta de dichas líneas celulares al efecto de este inhibidor. Por otra parte, las otras cinco líneas celulares analizadas, incluida la línea celular LoVo, presentan una disminución considerable de la proliferación tanto a los tres como a los seis días de tratamiento. En este ensayo las

Discusión

líneas más afectadas fueron HT-29 y SW620, ambas de CCR, con una disminución de aproximadamente el 95% de la proliferación a los seis días de tratamiento. Las líneas celulares IMIM-PC-2, IMIM-PC-1 y LoVo, también presentaron una importante reducción de su crecimiento, confirmándose así su sensibilidad a este inhibidor.

En último lugar, se estudiaron los efectos antiproliferativos de 17-AAG y NVP-AUY922 en cultivos primarios procedentes de muestras de tumores extirpados de pacientes con CCR intervenidos en el HCUVA y en el HUSL, como una forma de aproximación a los resultados que se obtendrían en clínica y la aplicabilidad de estos inhibidores en pacientes con este tipo de tumores. Hay que recordar que la realización de experimentos en este tipo de muestras es mucho más difícil que en líneas celulares tumorales establecidas, y que son poblaciones celulares muy heterogéneas, por lo que muchas veces la correlación de los resultados entre los cultivos primarios y las líneas celulares es muy compleja. Tras el procesamiento de multitud de muestras tumorales que llegaron a nuestro laboratorio, finalmente se realizaron ensayos de proliferación en 16 cultivos primarios (Tabla 8), que permanecieron en cultivo durante cierto tiempo. Los 16 cultivos primarios fueron tratados con concentraciones constantes de 17-AAG y de NVP-AUY922, y ambos inhibidores produjeron una disminución del crecimiento celular similar, alrededor de un 40% (Figura 33), aunque esta reducción de la proliferación no fue tan pronunciada como la producida por los inhibidores en las líneas celulares de CCR estudiadas. Además de estos ensayos, en cuatro de los cultivos primarios, denominados HCUVA-CC-1, HCUVA-CC-34, HCUVA-CC-1^{CT} y HCUVA-CC-3^{CT}, se realizaron ensayos de proliferación con concentraciones crecientes de cada inhibidor y se calculó el valor de su IC₅₀ para cada uno. Los resultados de estos experimentos muestran que uno de los cultivos primarios, HCUVA-CC-34, tiene un valor de IC₅₀ superior a 1 μM para ambos inhibidores y no responde bien a ninguno de los dos, por lo que, y del mismo modo que hicimos en las líneas celulares, según esta IC₅₀ es considerado resistente a 17-AAG y NVP-AUY922 (Figura 34 y Tabla 20). Este cultivo primario proviene de un tumor en estadio IV, el más avanzado de la enfermedad, con metástasis distantes, y estuvo recibiendo un tratamiento neoadyuvante, que consistió en la administración de los agentes quimioterápicos 5FU junto con leucovorina (LV) e irinotecan, antes del tratamiento quirúrgico (Tabla 9). El

cultivo HCUVA-CC-34 es el único modelo celular utilizado en el estudio que no responde a NVP-AUY922, y tampoco lo hace a 17-AAG (Figura 34 y Tabla 20). La resistencia que muestra este cultivo a los inhibidores de HSP90 quizás es debida a que son células con un mayor grado de agresividad por provenir de una muestra tumoral en estadio IV, o porque al ser un tumor previamente tratado, las células más sensibles a los fármacos antitumorales se han destruido, mientras que la subpoblación de células resistentes ha sobrevivido y sigue proliferando. Además, los ensayos en agar blando también mostraron una menor respuesta de este cultivo a 17-AAG y NVP-AUY922 (Figura 41 y 42), lo que nos confirmó la escasa respuesta de HCUVA-CC-34 a los inhibidores de HSP90. Por el contrario, los otros tres cultivos primarios responden bien a los inhibidores de HSP90. El cultivo primario que responde mejor a ambos inhibidores es HCUVA-CC-3^{CT} (Figura 34 y Tabla 20), y es un cultivo que proviene de una muestra tumoral de un CCR con un fenotipo de alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) que se encontraba en estadio III y que no ha recibido tratamiento previo (Tabla 9). Los cultivos HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-1^{CT} también son sensibles a 17-AAG y NVP-AUY922 (Figura 34 y Tabla 20). El primero proviene de una muestra anónima, por lo que no sabemos a qué tipo de CCR pertenece, y el segundo proviene de una muestra tumoral de un CCR de tipo serrado en estadio II (Tabla 9) que tampoco había sido tratado antes de la operación. En los ensayos de formación de colonias, los cultivos HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3^{CT} sufrieron una reducción similar del número de colonias tanto con 17-AAG, como con NVP-AUY922 (Figura 41 y 42). En general, los resultados obtenidos en los cultivos procedentes de muestras tumorales de pacientes pueden servir como antecedentes pre-clínicos del efecto citotóxico que podrían producir este tipo de fármacos en diferentes tipos y estadios de CCR.

2. Alteración en las cascadas de señalización PI3-K y MAPK por la inhibición de HSP90

La inhibición de las cascadas de señalización PI3-K/Akt y MAPK pueden proporcionar una nueva forma de abordar el tratamiento contra el CP y el CCR, ya que la desregulación y la sobreactivación de estas rutas es frecuente en las células de estos tipos de tumores, entre otros, y causante de la alteración de procesos celulares que contribuyen a la supervivencia [128, 129, 134, 135]. Teniendo en cuenta que varias de

Discusión

las proteínas que forman parte de estas cascadas son proteínas clientes de HSP90, la utilización de inhibidores de HSP90 podría interrumpir una misma ruta de señalización, en varios puntos y al mismo tiempo, por lo que se presenta como una estrategia muy interesante para combatir con éxito a las células cancerosas [71, 108]. Por tanto, el siguiente paso de nuestro trabajo fue estudiar cómo influye la inhibición de HSP90, producida por 17-AAG y NVP-AUY922, en los niveles de expresión de proteínas que pertenecen a las vías de transducción de señales PI3-K/Akt y MAPK, en los modelos tumorales de CP y de CCR utilizados en nuestro estudio.

Este estudio se inició con la familia de receptores HER, que son capaces de activar a ambas rutas y además son proteínas clientes de HSP90, por lo que nos pareció muy interesante analizar el efecto de los inhibidores de HSP90 sobre estos receptores. Dentro de los receptores HER, EGFR es uno de los receptores más estudiado como diana molecular para el tratamiento del cáncer, incluyendo el CP y el CCR, en los cuales puede encontrarse sobreexpresado frecuentemente [133]. Para determinar el efecto de 17-AAG y NVP-AUY922 sobre los niveles de expresión de los receptores HER, varias líneas celulares fueron tratadas a concentraciones constantes de 17-AAG o NVP-AUY922 a diferentes tiempos, y a continuación se analizaron sus niveles de expresión. Los resultados revelan que las líneas celulares sensibles al tratamiento con 17-AAG, IMIM-PC-2 y HT-29, y las líneas celulares sensibles a NVP-AUY922, SW620, Caco-2, IMIM-PC-2 e IMIM-PC-1, sufren una disminución importante de la expresión de estos receptores, sobretodo de EGFR y HER2 (Figura 43 y 44). Incluso en algunas líneas celulares, la reducción de los niveles de expresión de EGFR y de HER2 fue detectada tras sólo cuatro horas de tratamiento (IMIM-PC-1 y CFPAC-1, Figura 45). Además de las líneas celulares, cuatro cultivos primarios fueron tratados con 17-AAG y NVP-AUY922, y posteriormente los niveles de expresión de EGFR fueron analizados. En el cultivo HCUVA-CC-1 no se detectaron niveles de EGFR por lo que no se pudo valorar el efecto. En los otros tres cultivos primarios los resultados muestran una disminución de los niveles de expresión de EGFR tras el tratamiento con 17-AAG (Figura 48). Tras el tratamiento con NVP-AUY922, la disminución de los niveles de EGFR se produce considerablemente en el cultivo HCUVA-CC-1^{CT}, mientras que en los cultivos HCUVA-CC-

34 y HCUVA-CC-3^{CT}, la disminución fue evidente a una alta concentración de NVP-AUY922 (Figura 48).

Como hemos comentado, tanto EGFR como HER2 son proteínas clientes de HSP90 que dependen de ella para estabilizarse, y cuando HSP90 no funciona correctamente no alcanzan su conformación madura y acaban degradándose [273]. Los inhibidores utilizados en nuestro estudio, 17-AAG y NVP-AUY922, han demostrado que son capaces de disminuir los niveles de expresión de estos receptores en otros tipos de tumores. El inhibidor 17-AAG produce una disminución de EGFR en líneas celulares de glioma [274]. El inhibidor NVP-AUY922 produce una disminución de HER2 en células de cáncer de mama [226], y de EGFR en células de cáncer de pulmón no pequeñas [230]. En células tumorales neuroendocrinas, NVP-AUY922 también provocó una reducción los niveles de los receptores HER analizados (EGFR, HER2 y HER3) [275]. Estos resultados son similares a los determinados en nuestro estudio en modelos tumorales de CP y de CCR, ya que 17-AAG, en las líneas celulares sensibles y NVP-AUY922, en todas las líneas celulares analizadas producen una disminución de los niveles de los receptores HER (Figura 43 y 44). En los cultivos primarios, 17-AAG fue capaz de disminuir los niveles de expresión de EGFR, incluso en el cultivo HCUVA-CC-34 que no responde bien al efecto de este inhibidor, y NVP-AUY922 también disminuyó los niveles del receptor en los cultivos, aunque en menor medida que 17-AAG. Hay que destacar que 17-AAG y NVP-AUY922 han sido administrados en combinación con fármacos inhibidores específicos de receptores de la familia HER con el fin de conseguir un mejor beneficio antitumoral para los pacientes, y se han obtenido resultados positivos en combinación con el anticuerpo monoclonal trastuzumab, un inhibidor específico de HER2. En el caso de 17-AAG, se realizaron ensayos clínicos en pacientes cáncer de mama metastásico HER2-positivos [232, 233], y en el caso de NVP-AUY922 el estudio se realizó en líneas celulares de cáncer de mama y de cáncer gástrico, incluidos modelos con resistencia a trastuzumab adquirida [244].

A continuación, estudiamos los niveles de expresión de otras proteínas que se encuentran por debajo de los receptores HER, y que forman parte de las cascadas de señalización PI3-K/Akt y MAPK. En primer lugar, vamos a comentar los resultados relacionados con las proteínas que forman parte de la ruta PI3-K/Akt. Hay que recordar

Discusión

que varias de las proteínas incluidas en esta ruta son proteínas clientes de HSP90 (Akt, mTOR, p70S6K). Una de las proteínas estudiadas fue Akt total, y al analizar sus niveles de expresión en la línea celular de CP sensible a 17-AAG, IMIM-PC-2, es evidente que su expresión sufre una disminución tras 24 horas de tratamiento con 17-AAG (Figura 43). A tiempos más largos, se observa una leve disminución de los niveles de expresión de Akt en la línea celular Caco-2, probablemente debida a una exposición más larga a 17-AAG (48 horas) (Figura 43), aunque este fármaco no causa un gran efecto antiproliferativo en esta línea celular, como vimos en los ensayos de proliferación, y es considerada resistente a este inhibidor (Figura 30 y Tabla 17). Tras el tratamiento con NVP-AUY922 también se percibe una disminución de Akt total en las líneas de CCR, SW620 y Caco-2, a 24 y 48 horas de tratamiento (Figura 44, A), ambas sensibles a este inhibidor. Además, en la línea celular de CP, IMIM-PC-2, sensible también a los dos inhibidores, se analizó el estado de fosforilación de Akt 1/2/3, de los tres residuos en conjunto (pan) y por separado, y los resultados revelaron que se produce una disminución de su estado de fosforilación en respuesta al tratamiento con 17-AAG (Figura 46, A) y con NVP-AUY922 (Figura 46, B), por lo que la activación de esta proteína quinasa está reducida por efecto de los inhibidores de HSP90. La disminución de la fosforilación constitutiva de Akt y la reducción de la expresión de Akt total ha sido anteriormente descritas como una consecuencia del tratamiento con 17-AAG en líneas celulares de CP [276] y de CCR [277], y después del tratamiento con NVP-AUY922 en otros tipos de líneas celulares tumorales [272, 275].

La alteración de la proteína Akt en nuestro modelo *in vitro* de CP y de CCR por parte de los inhibidores de HSP90 es un resultado muy destacable si pensamos en el papel que juega Akt modulando numerosas moléculas relacionadas con la supervivencia, diferenciación celular y otros procesos relacionados con la progresión tumoral [122, 123]. A esto hay que sumar que en el CP y en el CCR, Akt suele estar sobreactivada [278, 279], por lo que las líneas celulares que provienen de estos tipos de tumores podrían tener una mayor dependencia del correcto funcionamiento de Akt, y por tanto su inhibición en este tipo de tumores es más valiosa, aún si cabe.

El estudio de la alteración de los niveles de expresión de proteínas causado por 17-AAG y NVP-AUY922 continuó con algunas de las proteínas que están por debajo de

Akt en la cascada de señalización, y son reguladas por ella. Entre las proteínas que pueden ser activadas por Akt, encontramos la proteína mTOR, que participa en la síntesis de proteínas necesarias para la proliferación, el ciclo celular y el metabolismo celular, entre otras funciones. Una de las proteínas efectoras de mTOR, la quinasa p70S6K, y uno de los sustratos principales de p70S6K, la proteína ribosomal S6 (RPS6), fueron incluidas en nuestro estudio. Ambas proteínas están relacionadas con la síntesis de proteínas, al igual que mTOR. Los experimentos realizados en las células IMIM-PC-2, tratadas con 17-AAG y NVP-AUY922 durante 24 horas indican que hay una reducción del estado de fosforilación de p70S6K y de RPS6 (Figura 46 y 47), por lo que la activación de ambas se ve disminuida tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90.

En resumen, los resultados nos indican que varias proteínas que forman la cascada de señalización PI3-K/Akt experimentan una disminución de su activación tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 en la línea celular de CP IMIM-PC-2. La disminución del estado de fosforilación de Akt y de p70S6K podría deberse a una degradación de proteína total, ya que ambas son proteínas clientes de HSP90, o por la disminución en los niveles de expresión de proteínas que se encuentran por encima de ellas en la ruta, y que suelen provocar su fosforilación.

Por otro lado, también se analizó el estado de fosforilación de la proteína RPS6 en otras líneas celulares, tanto de CP como de CCR, y los resultados mostraron que la línea resistente a 17-AAG, PANC-1 no presenta cambios en los niveles de fosforilación RPS6, y la línea celular Caco-2, también resistente a 17-AAG, muestra una disminución leve del estado de fosforilación de esta proteína (Figura 47, A). Por otra parte, la línea celular de CCR, HT-29, y la línea celular de CP, IMIM-PC-2, sensibles a 17-AAG, presentan una disminución total de la fosforilación de RPS6 (Figura 47, A). La disminución de la activación de RPS6 también se produce en las todas las líneas celulares que fueron tratadas con NVP-AUY922 (Figura 47, B). Respecto a RPS6, hay que destacar que aunque no existen muchos estudios que mencionen su papel en el desarrollo del cáncer, un trabajo realizado en un modelo murino de CP en el que los ratones tenían suprimida la fosforilación de RPS6 (p-RPS6), demostró que los ratones sin posibilidad de expresión de p-RPS6 desarrollaban menos lesiones precursoras de CP, lo

Discusión

que podría significar que la activación RPS6 tiene un papel relevante en la iniciación de este tipo de tumores [280].

En segundo lugar, vamos a comentar los resultados relacionados con las proteínas que forman parte de la ruta MAPK, de gran relevancia para el CP y el CCR por la frecuencia de mutaciones que presentan estos tumores en oncogenes como KRAS o BRAF [19, 41, 131, 132], y que mantienen activa esta cascada en las células cancerígenas. La ruta MAPK suele describirse como una cascada de señalización que se inicia por la activación de Ras, seguida de Raf, Mek 1/2, y su última proteína efectora, Erk 1/2. Algunas quinasas de esta ruta (Raf-1, B-Raf) son proteínas clientes de HSP90, pero es la activación de la última quinasa Erk 1/2, la encargada de regular numerosos sustratos que participan en diversos procesos celulares [127], por lo que nos interesó analizar si el efecto de los inhibidores de HSP90 interfería en la señalización de la última quinasa de la ruta, Erk 1/2, aunque no sea directamente una proteína cliente de HSP90. Los niveles totales de Erk 1/2 no se ven alterados tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90, pero sí se observa una disminución en su estado de activación en respuesta a 17-AAG en las líneas sensibles, y a NVP-AUY922 en todas las líneas celulares analizadas (Figura 43 y 44). La reducción de los niveles de fosforilación de Erk 1/2 detectados en las líneas celulares incluidas en nuestro estudio tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90 es similar a los resultados observados en otros estudios, tanto para 17-AAG como para NVP-AUY922 [274-276]. En los cultivos primarios, 17-AAG produce una disminución de la fosforilación de Erk 1/2 (p-Erk 1/2) en todos ellos, mientras que NVP-AUY922 sólo lo hizo en el cultivo HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-1^{CT} (Figura 48). En el cultivo HCUVA-CC-3^{CT} la disminución de p-Erk1/2 se observa a una concentración alta de NVP-AUY922; en cambio, en el cultivo HCUVA-CC-34 la disminución fue muy leve a las dos concentraciones utilizadas de NVP-AUY922 (Figura 48). Estos resultados se correlacionan con la moderada disminución del receptor EGFR que también se observa en estos dos cultivos tras el tratamiento con NVP-AUY922. En ambos casos, el inhibidor 17-AAG causa una mayor reducción en los niveles de EGFR y de p-Erk 1/2, aunque los efectos producidos por 17-AAG y NVP-AUY922 en los ensayos de proliferación para estos dos cultivos fueron muy parecidos (Figura 34 y 41).

Además de p-Erk 1/2, el estado de fosforilación de una proteína que se encuentra “aguas abajo” de la ruta MAPK y es regulada directamente por la señalización de Erk 1/2, como es la quinasa RSK1, fue analizada. Esta proteína también está relacionada con la ruta PI3-K/Akt, ya que se ha descrito que puede activar a mTOR [258]. La quinasa RSK1, también llamada p90S6K, pertenece a una subfamilia de quinasas ribosomales S6 y está implicada en el crecimiento, la supervivencia y otros procesos celulares [259]. El estado de fosforilación de RSK1 tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 fue determinado en la línea celular de CP IMIM-PC-2, y los resultados indican una disminución de los niveles de fosforilación de esta proteína quinasa (Figura 46) en las células tratadas, como ocurre con la activación de otras proteínas estudiadas. Por lo que una vez más, se afianza el hecho de que las señales transmitidas a través de estas rutas son interrumpidas por la inhibición de HSP90.

Por otro lado, y al mismo tiempo que se analizaban los niveles de expresión de proteínas clave de las rutas de señalización PI3-K/Akt y MAPK, se determinaron los niveles de expresión de HSP70 en las células tratadas. Los resultados indican un rápido incremento de expresión de la co-chaperona HSP70 en todas las líneas celulares sensibles a los inhibidores 17-AAG y NVP-AUY922 (Figuras 43 y 44), detectable a las 4 u 8 horas de tratamiento (Figura 45) y en los cuatro cultivos primarios analizados (Figura 48). La chaperona HSP70 ha sido descrita como un biomarcador de respuesta a la inhibición de HSP90, y el incremento de su expresión ha sido puesto de manifiesto en numerosos trabajos donde se utilizan agentes inhibidores de HSP90. Se sabe que en condiciones de estrés, la inducción de los niveles de HSP70 está mediada por la actividad del factor de choque térmico 1 (HSF-1), que es el principal factor de transcripción de la respuesta de choque térmico [281]. En condiciones basales, HSP90 está unida a HSF-1 [282], pero cuando las células sufren un estímulo estresante, otras proteínas comienzan a unirse a HSP90 y HSF-1 queda liberado produciendo un aumento de las proteínas de choque térmico (HSPs). La interacción de los inhibidores de HSP90 con esta chaperona impide la asociación de HSF-1 y HSP90, desencadenando la respuesta de choque térmico celular y el incremento de chaperonas como HSP70 [283, 284]. Nuestros resultados muestran una relación entre la sensibilidad de las líneas celulares a los inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922, y el incremento de HSP70.

Solamente un leve aumento de HSP70 fue detectado en la línea celular resistente a 17-AAG Caco-2. En esta línea celular, 17-AAG también produce ligeros cambios en los niveles de expresión de otras proteínas analizadas, como se ha comentado anteriormente. En los cultivos primarios hay un incremento de HSP70 tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922, a excepción del cultivo HCUVA-CC-34 tras el tratamiento con una concentración baja de NVP-AUY922 (Figura 48). Este cultivo, como ya hemos comentado, no muestra una gran inhibición de la proliferación tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90. Aun así, estos fármacos aumentan la expresión de HSP70, lo que indica que HSP90 está inhibida. Es posible que este cultivo sea capaz de adaptarse y seguir sobreviviendo aunque esta chaperona no funcione bien. Por último, los niveles de expresión de HSP90 también fueron analizados, y al contrario que ocurre con los niveles de HSP70, la expresión de HSP90 se mantiene inalterada tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922.

3. Efectos sobre el ciclo celular y muerte celular producidos por la inhibición de HSP90

Los inhibidores de HSP90 causaron cambios en el ciclo celular de las líneas celulares de CP y de CCR incluidas en este estudio. Además, y en última instancia, en las células sensibles a los inhibidores, también se observó la inducción de muerte celular, uno de los objetivos perseguidos por los tratamientos antitumorales citotóxicos. Probablemente, esta desregulación del ciclo celular y sus consecuencias es debida a una incorrecta actividad de HSP90 tras su inhibición. Como ya hemos explicado, HSP90 es una chaperona necesaria para una adecuada progresión dentro del ciclo celular, ya que algunas proteínas clave en la regulación del ciclo celular forman parte de la batería de proteínas clientes de HSP90. A continuación, vamos a comentar en detalle lo que hemos observado en los modelos celulares de CP y de CCR.

En cuanto a los cambios ocurridos en el ciclo celular tras el tratamiento de los inhibidores de HSP90, 17-AAG y NVP-AUY922, en las líneas celulares de CP y de CCR estudiadas, se produce una acumulación de las células, o bloqueo, en la fase G₂/M del ciclo celular en las líneas sensibles a estos inhibidores (Figuras 49, 51, 52 y 53, Tablas 22, 23, 24 y 25), a excepción de la línea celular IMIM-PC-2, en las cuales el inhibidor 17-AAG produce un bloqueo en la fase G₁ (Figura 49, A), y de la línea celular LoVo, en las

que se aprecia un incremento de la fase SubG₁, sin una acumulación previa en ninguna fase del ciclo celular, tras el tratamiento con ambos inhibidores (Figuras 51, D, y 53, D). En los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3^{CT}, también se produce una acumulación de las células en la fase G₂/M tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 (Figura 54 y Tabla 26). Otros estudios han demostrado que los inhibidores de HSP90 causan acumulación de las células en diferentes fases del ciclo celular en líneas celulares tumorales, y la diferente acumulación en una fase u otra parece depender del contexto celular y de las proteínas clientes afectadas [155]. Por ejemplo, en líneas cancerígenas de vejiga un estudio describió una acumulación de las células ejercida por 17-AAG en la fase G₁ [285], pero otros estudios han demostrado que este mismo inhibidor produce una acumulación de células tumorales de CCR en la fase G₂/M [277], incluyendo la línea celular HT-29, la cual también muestra una acumulación en la fase G₂/M en nuestros experimentos (Figura 51, A), y en líneas de cáncer de pulmón [286]. Para NVP-AUY922, el estudio realizado por Lee y colaboradores en líneas celulares de cáncer gástrico determinó que algunas de las células quedaban bloqueadas en la fase G₁ y otras en la fase G₂/M del ciclo celular tras el tratamiento con este inhibidor [272]. Según Burrows y colaboradores [155] es posible que el hecho de que las células queden acumuladas en un punto u otro del ciclo depende de varios factores, y en el caso de las células que se quedan bloqueadas en la fase G₁, como ocurre en la línea IMIM-PC-2 (Figura 49, A) en nuestro trabajo, esté relacionado con varias causas. Por un lado, puede deberse a un defecto en la proteína Retinoblastoma (Rb) que participa en la entrada en la fase S y la síntesis de ADN, o por otro lado, deberse a que las células alteradas por la inhibición de HSP90 no sean capaces de superar el primer punto de control o parada en el ciclo, que se encuentra al final de la fase G₁. Por último, este bloqueo también podría ser debido a la alteración de las proteínas clientes de HSP90 relacionadas con la actividad del punto de control de G₁/S. Otro estudio llevado a cabo en líneas tumorales con el inhibidor de HSP90, herbimicina A, propuso que la acumulación de las células en la fase G₁ del ciclo está relacionada con la disminución de la expresión y la actividad quinasa de las ciclinas D y E y sus Cdk's y la hipofosforilación de Rb [287]. Cuando la proteína Rb se encuentra en estado hipofosforilado, el factor de transcripción E2F permanece inactivo, de manera que la progresión de las células hacia la fase S se ve impedida. Pero cuando Rb es fosforilada por los complejos ciclinas-Cdk's que participan

Discusión

en la fase G_1 , las células avanzan hacia la fase S. En nuestro trabajo, la línea celular IMIM-PC-2 presenta una acumulación de las células en la fase G_1 producida por el tratamiento de 17-AAG (Figura 50), y también se determinó que se producía una reducción de los niveles de expresión de la ciclina D1, que es una de las ciclinas que participa en la fosforilación de Rb, lo que apoya que haya una acumulación de las células en la fase G_1 del ciclo en esta línea celular.

Así mismo, interesados en la acumulación de las células o bloqueo que sufren la mayoría de las líneas celulares en la fase G_2/M tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90, quisimos ampliar el estudio de este bloqueo en esta fase del ciclo celular. Para ello, utilizamos el inhibidor NVP-AUY922, ya que es un fármaco mucho más novedoso que 17-AAG y todas líneas celulares de CP y de CCR analizadas son sensibles a él. Esta parte del trabajo consistió en analizar los niveles de expresión de dos proteínas moduladoras clave en el avance de las células de la fase G_2 del ciclo hacia la fase M (mitosis), como son la ciclina B1 y la quinasa dependiente de ciclinas Cdc2 (CDK1), que además, han sido descritas como proteínas clientes de HSP90. Estas proteínas se unen formando un complejo entre la fase S y G_2 , y cuando este complejo es activado se inicia la mitosis. Este complejo se mantiene activo hasta la metafase, participando en la regulación de eventos que se producen durante la mitosis como la condensación cromosómica, la ruptura de la membrana nuclear, el ensamblaje del huso acromático, entre otros. Las Cdks están reguladas por diferentes procesos, como su estado de fosforilación. En concreto, Cdc2 necesita estar fosforilada en el residuo treonina 161 (Thr161) para tener actividad quinasa [137], y además, tiene que ser desfosforilada en dos residuos, uno en treonina 14 (Thr14) y otro en tirosina 15 (Tyr15), ya que estas fosforilaciones mantienen inhibida su actividad quinasa. La fosforilación de estos residuos está regulada por el equilibrio que existe entre la actividad de la fosfatasa Cdc25C, y de las quinasas Wee1 y Myt1 [262]. Cuando Cdc2 está asociada con su subunidad reguladora, la ciclina B, y es desfosforilada en Thr14 y Tyr15, su actividad quinasa se pone en funcionamiento y se desencadena la entrada de las células en mitosis [263]. Al final de la mitosis se produce la degradación de la ciclina B, y el complejo deja de funcionar [264], provocando la salida de las células de la mitosis.

Los experimentos realizados al respecto en nuestro trabajo muestran una disminución de la fosforilación de Cdc2 (Tyr15) y Cdc2 total en una línea celular de CP y otra de CCR (Figura 59 y 60), y en algunos cultivos primarios de CCR (Figura 61), tras el tratamiento con NVP-AUY922. La disminución de la fosforilación de Cdc2 indica que Cdc2 está activada, y por tanto las células pueden avanzar hacia la fase M. Esta reducción en la fosforilación puede ser consecuencia de la disminución de los niveles de proteína total de Cdc2 o puede deberse a que las proteínas encargadas de la regulación de su fosforilación también se vean alteradas por la inhibición de HSP90. Además, la disminución de Cdc2 total también puede causar un descenso en la formación del complejo ciclina B1/Cdc2. Por otro lado, NVP-AUY922 no fue capaz de provocar cambios significativos en los niveles de expresión de la ciclina B1, a pesar de que ésta también es proteína cliente de HSP90. Esto nos indica que no todas las proteínas clientes se ven alteradas del modo mismo tras la inhibición de HSP90, y mientras algunas proteínas clientes se degradan rápidamente como hemos visto anteriormente, otras, como la ciclina B1 no sufren cambios a la misma concentración y tiempo de exposición al fármaco en los modelos tumorales de CP y de CCR estudiados. Otros autores han descrito resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio, con una reducción de los niveles de expresión de Cdc2. Sin embargo, también detectaron una disminución en los niveles de ciclina B1 tras el tratamiento con este fármaco, pero en otros modelos celulares y a un tiempo de tratamiento más largo (72 horas) [272].

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, decidimos que también podría ser interesante sincronizar una línea celular (CFPAC-1) para comprobar si cuando las células partían desde el mismo punto del ciclo celular, se acumulaban en la misma fase del ciclo celular, que cuando no están sincronizadas. Para ello, las células se trataron con afidicolina, un fármaco que produce una acumulación al final de la fase G₁ e inicio de la fase S del ciclo celular de forma reversible [248, 249], y a continuación fueron liberadas y tratadas con NVP-AUY922. Este ensayo, realizado en la línea celular de CP CFPAC-1, reveló que las células sincronizadas tratadas con NVP-AUY922 efectivamente se quedaban acumuladas en la fase G₂/M, mientras que las células no tratadas volvían a un patrón de ciclo celular normal (Figura 62). De manera adicional, los niveles de expresión de Cdc2 total y de su fosforilación (Tyr15) también fueron determinados en

Discusión

las células sincronizadas con afidicolina y en las células tratadas con NVP-AUY922 tras la sincronización. Al igual que ocurrió en las células sin sincronizar, los resultados indican una reducción tanto de la activación como de los niveles totales de Cdc2 (Figura 63). Nuestro grupo de investigación en un trabajo previo determinó en células de glioblastoma [288], un tumor muy agresivo y con un alto grado de resistencia a los tratamientos, un bloqueo de las células en la fase G₂/M del ciclo tras el tratamiento del inhibidor de HSP90 natural ansamicínico GA, precursor de 17-AAG. Esta acumulación en G₂/M era evidente tanto en células sin sincronizar como en las que partían desde el mismo punto del ciclo, o sincronizadas, de forma similar a lo que ocurre en la línea celular CFPAC-1 tras el tratamiento con NVP-AUY922. En este estudio, se determinaron también los niveles totales de Cdc2 y su actividad, y del mismo modo que NVP-AUY922 reduce los niveles de Cdc2 en las líneas celulares analizadas en nuestro trabajo, GA hacía lo propio en estas células (sincronizadas y no sincronizadas).

Estos resultados, y los presentados con diferentes inhibidores de HSP90 mencionados anteriormente [272, 286], secundan el hecho de que el bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular provocado por los inhibidores de HSP90 podría estar relacionado por diversos factores entre los que se encuentran los desajustes de la proteína Cdc2.

Además del estudio de las proteínas implicadas en la transición de la fase G₂ hacia la mitosis, también quisimos investigar si las líneas celulares que presentaban una acumulación en la fase G₂/M del ciclo celular tras el tratamiento con los inhibidores de HS90, alcanzaban la fase de mitosis. Para ello, se realizaron experimentos para determinar los niveles de fosforilación de la histona H3 (fosfo-histona H3). Las histonas y otras proteínas participan en la condensación de los cromosomas, proceso que sucede durante la división celular. Concretamente, una de estas histonas, la H3, es extensamente fosforilada durante la mitosis y este hecho ha sido utilizado como un sello distintivo de esta fase del ciclo celular [261]. El estudio de los efectos provocados por los inhibidores de HSP90 revela que los niveles de fosfo-histona H3 (Ser 28 y Ser10) se incrementan en las líneas celulares sensibles a 17-AAG y NVP-AUY922 analizadas (Figuras 55 y 58, Tablas 27 y 28), que además experimentan un bloqueo en la fase G₂/M. En el cultivo primario HCUVA-CC-1 también se observa un leve incremento de la fosfo-histona H3 (Ser10), cuando estas células son tratadas con 17-AAG o con NVP-

AUY922 (Figura 58, D, Tabla 28). El incremento de la histona H3 fosforilada en las células tratadas confirma que hay un mayor porcentaje de células en mitosis tras el tratamiento con estos fármacos, que en las células sin tratar; y por tanto, que los inhibidores de HSP90 promueven su entrada en mitosis. Además, el incremento de la fosfo-histona H3 está acompañado por una morfología anormal de los núcleos que se encuentran en mitosis, como pudimos comprobar en los ensayos mediante microscopía de fluorescencia (Figura 57). Ciertamente, otros trabajos publicados al respecto han confirmado que 17-AAG induce la formación de figuras mitóticas anormales o aberrantes, acompañadas de un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular [289]. Las figuras mitóticas formadas en dicho trabajo [289] se caracterizaron por presentar múltiples centrosomas y una pérdida del alineamiento de los cromosomas en el huso acromático. Para otros inhibidores de HSP90, como es el caso de NVP-HSP990, también se ha observado un bloqueo en la fase G₂/M y la formación de núcleos mitóticos anormales en líneas células de CP y de glioblastoma [290].

Las características morfológicas anteriormente mencionadas son fenómenos singulares que se han asociado a un mecanismo de muerte celular denominada catástrofe mitótica, y así fue mencionado en los trabajos donde hallaron estas figuras mitóticas aberrantes. Este término, en definitiva, se utiliza para describir un tipo de muerte celular, aunque existe controversia sobre si es un mecanismo de muerte celular propiamente dicho, o más bien es un mecanismo previo a un proceso de muerte celular "clásico". Este debate surgió a partir de resultados que mostraban cómo las células con fallos en la maquinaria mitótica inducen procesos como la apoptosis, necrosis, o incluso pueden conducir a las células hacia un estado de senescencia. Por estos motivos, este tipo de muerte ha sido más bien definido como un mecanismo oncosupresivo, a partir del cual se desencadena un proceso de muerte celular o la senescencia [149, 291, 292].

En general, la catástrofe mitótica es un mecanismo que intenta evitar la inestabilidad genómica en las células, provocada por perturbaciones de la maquinaria mitótica, como la micronucleación, que suele conducir a una segregación aberrante de los cromosomas, y por la multinucleación, consecuencia de fallos en la citocinesis que hacen que una célula presente más de un núcleo [146]. Galluzzi y colaboradores [291] han descrito cuatro características que definen la catástrofe mitótica: comienza por

Discusión

perturbaciones en el aparato mitótico, se produce durante la fase de mitosis, suele ir acompañada de una parada en la fase de mitosis y por último, produce muerte celular o senescencia en las células. En nuestro trabajo, no hemos podido ver tan claramente las características morfológicas que confirman la presencia de micro o multinucleación, pero sí se aprecian formas aberrantes en los núcleos mitóticos de las células tratadas con los inhibidores de HSP90, que pueden hacernos pensar que las células de nuestro estudio, efectivamente tienen disfunciones en el sistema mitótico (Figuras 57 y 58). En resumen, los resultados de los experimentos han mostrado alteraciones en los niveles de expresión de Cdc2 y en su fosforilación (Tyr15) en dos líneas celulares diferentes, CFPAC-1 y Caco-2 (Figura 59), en las cuales también se observan figuras mitóticas anormales (Figura 58, B y C), además de un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular (Figuras 52,D, y 53, B) y un incremento de células en la fase de mitosis (Figura 55,B) tras el tratamiento con NVP-AUY922. Por tanto, es probable que estas células, CFPAC-1 y Caco-2, sufran un proceso de catástrofe mitótica a consecuencia de la inhibición de HSP90.

Además de los efectos en el ciclo celular descritos anteriormente, como el bloqueo en la fase G₁ producido por 17-AAG en la línea de CP IMIM-PC-2, o el bloqueo en la fase G₂/M producido por 17-AAG y NVP-AUY922 en varias de las líneas celulares analizadas, el tratamiento con los inhibidores de HSP90 produce un aumento de los niveles de la fase SubG₁ en las células sensibles, indicativo de que las células experimentan un proceso de muerte celular (Figuras 49, 51, 52 y 53). La presencia de muerte celular se corresponde con los efectos antiproliferativos también vistos en las células sensibles en los ensayos de proliferación celular descritos al inicio del trabajo (Figuras 29, 30, 31 y 32). Al profundizar en el mecanismo de muerte celular mediante experimentos de citometría de flujo con Anexina V, un indicador de apoptosis temprana, y el estudio de la cromatina por microscopía de fluorescencia, observamos que la línea celular de CP IMIM-PC-2 presenta características propias de un proceso apoptótico cuando son tratadas con ambos inhibidores, como son el incremento de las células marcadas con Anexina V (Figura 64 y 66) y la formación de núcleos con cromatina fragmentada (Figura 66 y 68). La muerte celular por apoptosis debida al tratamiento por 17-AAG y NVP-AUY922 ha sido observada por diferentes autores en

numerosos tipos de células cancerígenas [227, 228, 272, 275, 277, 285, 286], aunque este tipo de muerte no está presente en todos los casos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Hostein y colaboradores [277] en líneas de adenocarcinoma de colon, demostró que 17-AAG inducía apoptosis en todas las líneas celulares excepto en una, a pesar de que esta línea presentaba una respuesta similar con respecto a la viabilidad celular y la reducción de proteínas clientes a otras líneas que sí sufrían apoptosis. De igual modo ocurre en el trabajo presentado por Lee y colaboradores [272] en células de cáncer gástrico, donde NVP-AUY922 sólo produjo apoptosis en una de las líneas celulares, a pesar de que todas ellas eran muy sensibles al inhibidor. Parece claro que no todas las líneas celulares sensibles a estos inhibidores responden del mismo modo a la inhibición de HSP90 con respecto a los mecanismos de muerte celular, sino que los factores necesarios para inducir un tipo de muerte u otra podrían depender de las características intrínsecas de cada tipo de célula, según las proteínas clientes de HSP90 que se ven alteradas en ellas.

En nuestro trabajo, la línea celular de CP CFPAC-1 que tras el tratamiento con NVP-AUY922 queda bloqueada en la fase G_2/M del ciclo celular y presenta figuras mitóticas aberrantes, también experimenta un aumento de la fase $SubG_1$ (Figura 52, D), indicativo de muerte celular, probablemente debida a un proceso de catástrofe mitótica, como hemos comentado anteriormente. Además, en esta línea celular se produce un incremento en el número de células positivas para Anexina V y para 7-AAD, por lo que son células que se encuentran en un proceso de apoptosis tardía o directamente mueren por necrosis (Figura 66). Estos resultados indican que el mecanismo de muerte que se produce en esta línea celular es diferente al que se ocasiona en la línea IMIM-PC-2, a igual concentración y tiempo de exposición a NVP-AUY922. Sin embargo, también hay que pensar que las diferentes vías de muerte celular dependen de cascadas de señalización altamente complejas, y que la presencia de una no descarta que se desencadenen otros posibles tipos de muerte, ya que más de un tipo de muerte puede producirse de forma simultánea.

Por otro lado, también hay que tener en cuenta que los inhibidores de HSP90 pueden activar la inducción de la expresión de otras chaperonas, como HSP70, impidiendo la asociación entre HSF-1 y HSP90, como comentamos anteriormente [283,

Discusión

284]. Esta inducción puede influir en los efectos que provocan los inhibidores de HSP90 en las células tumorales, ya que algunas chaperonas tienen una función citoprotectora y pueden activar señales anti-apoptóticas. La chaperona HSP70 participa como una co-chaperona de HSP90, y además es altamente inducible en células que están sufriendo un proceso estresante o negativo para la célula, al igual que ocurre con HSP27. Ambas son capaces de modular la ruta de señalización de la apoptosis en diferentes puntos, protegiendo a las células de este fenómeno, y por tanto aumentando su supervivencia. De hecho, inhibidores de las chaperonas HSP70 y HSP27 han sido propuestos como posibles agentes quimioterápicos [293]. Un estudio realizado con una construcción anti-sentido de HSP70 disminuyó la proliferación de una línea celular de cáncer gástrico e indujo su apoptosis [294], poniendo de manifiesto el importante papel que juega esta chaperona en la supervivencia celular. Otros estudios han informado de la sensibilización a los inhibidores de HSP90 que sufren las células donde la expresión de HSP70, u otras proteínas relacionadas, han sido anuladas. En uno de ellos, se demostró que el silenciamiento de los niveles endógenos de HSP70 y la inhibición farmacológica de la inducción de HSP70 en células tumorales de leucemia mieloide aguda potenciaba el efecto antitumoral de 17-AAG [284]. En otro estudio, teniendo en cuenta que el incremento de la expresión de HSPs, como HSP70, está mediado por el factor HSF-1, se utilizaron ratones “knock-out” para HSF-1, y en células derivadas de estos ratones se comprobó que, tras el silenciamiento de HSF-1, las células respondían mejor al tratamiento con inhibidores de HSP90 [283]. Más recientemente, un trabajo realizado en células de CCR y de carcinoma de ovario demostró que el silenciamiento simultáneo de la isoforma inducible de HSP70, HSP72, y su forma constitutiva, HSC70, suprimía la actividad anti-apoptótica de estas chaperonas y provocaba un aumento considerable de la apoptosis producida por 17-AAG [295]. De igual modo que la chaperona HSP70, la inducción de la expresión de la chaperona HSP27 también tiene un efecto citoprotector en células tumorales frente a 17-AAG, y su silenciamiento es capaz de aumentar la sensibilidad al inhibidor en ensayos de formación de colonias [296].

Por tanto, la susceptibilidad de las células tumorales a sufrir una muerte celular por apoptosis cuando son tratadas por los inhibidores de HSP90 también depende del equilibrio entre las señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas o de supervivencia que se

generan tras el tratamiento. Además, como ya hemos mencionado, otras rutas de muerte celular pueden ser activadas y predominar o coexistir con procesos apoptóticos. Probablemente de ahí que las diferentes líneas celulares no siempre presenten la misma forma de muerte celular al ser tratadas con los inhibidores de HSP90.

4. Limitaciones de 17-AAG como inhibidor de HSP90

La búsqueda continua de nuevas moléculas capaces de inhibir eficazmente a HSP90 no se ha frenado durante las dos décadas desde que se descubrió el gran potencial que tenían como agentes antitumorales. Esto se debe al objetivo de intentar encontrar inhibidores que produzcan mejores resultados y que ofrezcan ventajas farmacológicas con respecto a los ya conocidos. Una de los primeros inhibidores de HSP90 estudiado fue 17-AAG, pero los inconvenientes asociados a su administración y su baja actividad antitumoral en estudios clínicos, han frenado su desarrollo y han hecho que los ensayos en pacientes se hayan centrado en otros inhibidores de HSP90 con mejores características, como es el caso de NVP-AUY922 y otras moléculas sintéticas.

Algunos estudios han puesto de manifiesto que la baja respuesta a 17-AAG está relacionada con la presencia de quinonas reductasas, y de bombas de extrusión de compuestos. Partiendo de esta información, quisimos estudiar más detenidamente la escasa o prácticamente nula respuesta que presentan algunas líneas celulares de los paneles de CP y de CRR utilizados en nuestro estudio, frente al tratamiento con 17-AAG (Figuras 29 y 30, Tablas 16 y 17), y si dichos mecanismos podrían estar relacionados con esta resistencia. Nuestra investigación comenzó por determinar los niveles de expresión de algunos transportadores de membrana dependientes de ATP o ABC (Mdr-1, MRP1 y BCRP1) en todas las líneas celulares incluidas en nuestro trabajo (Figura 68 y 69). La sobreexpresión de algunos miembros de esta familia de transportadores en células tumorales constituye uno de los principales obstáculos de la terapia antitumoral, ya que son capaces de expulsar activamente fármacos al exterior de la célula, y son característicos en el mecanismo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) [201].

De hecho, experimentos realizados en células tratadas con GA, precursor de 17-AAG, puso de manifiesto que las células donde Mdr-1 (P-gp) era inhibida, la

Discusión

concentración intracelular de GA se incrementaba y su citotoxicidad aumentaba considerablemente [199]. Sin embargo, otro estudio evidenció que la inhibición farmacológica de la actividad de ese mismo transportador no incrementó la sensibilidad a 17-AAG en células modificadas y resistentes a GA que sobreexpresaban Mdr-1 tras la resistencia adquirida o que también expresaban BCRP, otro transportador ABC [200]. Sin embargo, estos mismos autores comprobaron que células transfectadas con sobreexpresión de Mdr-1 presentaban una mayor resistencia a 17-AAG que las mismas células no transfectadas, por lo que Mdr-1 podría ser un factor influyente en la escasa respuesta al tratamiento con 17-AAG. Recientemente, un estudio realizado por Zhang y colaboradores [297] sugiere el uso de nuevos inhibidores de HSP90 en tumores con un fenotipo MDR intrínseco o adquirido, ya que sus resultados demostraban que la actividad antitumoral de inhibidores de HSP90 de naturaleza ansamcínica, incluyendo 17-AAG, se veía comprometida por la expresión tanto de Mdr-1 como de MRP1, otro transportador común en el fenotipo MDR. Los análisis realizados en nuestro estudio mediante Western blot, muestran que dentro del panel de líneas celulares de CP y de CCR, existen varias líneas que expresan transportadores ABC vinculados con el fenotipo MDR. En concreto, cuatro líneas de CCR expresan Mdr-1, una línea de CCR expresa MRP1, y siete líneas celulares de CCR y una de CP expresan BCRP1 (Figuras 68 y 69). A pesar de la presencia de transportadores ABC en dichas líneas celulares no hemos podido establecer una implicación de los mismos en la resistencia a 17-AAG que presentan algunas de las líneas celulares, ya que precisamente las líneas más resistentes, ambas de CP (PANC-1 y CFPAC-1), no expresan ningún transportador (Figuras 69). En concordancia con este resultado, otro estudio concluyó que ni Mdr-1, ni la proteína mutante p53 estaban relacionadas con la sensibilidad de líneas celulares de CP al tratamiento con 17-AAG [298]. En cuanto a las líneas de CCR (Figuras 69 y 70), observamos que las líneas celulares con peor respuesta a 17-AAG en ensayos de proliferación, Caco-2 y en menor medida, LoVo, expresan niveles muy bajos de BCRP1 y de Mdr-1, respectivamente. Sin embargo, estos resultados no parecen influir en su baja respuesta a 17-AAG, ya que otras líneas celulares también expresan estos transportadores y aun así son sensibles a 17-AAG. Por tanto, en estos tipos de tumores, si tenemos en cuenta las líneas celulares analizadas en este trabajo, los tres transportadores ABC estudiados no parecen estar implicados en la resistencia a 17-AAG.

Otros factores que se han descrito como posibles mediadores en el efecto antitumoral de 17-AAG incluyen la expresión de la enzima reductasa NQO1. Esta enzima es capaz de reducir a las benzoquinonas ansamicínicas como 17-AAG, y curiosamente el metabolito formado tras la reducción de 17-AAG, 17-AAGH₂, es un inhibidor de HSP90 que tiene mayor afinidad por HSP90 que 17-AAG [195, 196]. De hecho, varios estudios que han revisado como afecta la expresión de NQO1 en células tumorales a su sensibilidad frente 17-AAG [266, 299], indican que la expresión de NQO1 juega un papel importante en los efectos provocados por 17-AAG, probablemente debido a la capacidad de NQO1 de reducir a 17-AAG a un compuesto más eficaz contra HSP90. Esto podría proporcionar una ventaja terapéutica en los tejidos tumorales que presentan altos niveles de NQO1, donde 17-AAG lograría mejores efectos antitumorales. De manera interesante, esto ocurre con frecuencia en varios tumores, entre los que se encuentra el CP y el CCR, donde la expresión de NQO1 puede ser elevada [300-303], debido probablemente a la función antioxidante de NQO1 que confiere a las células cancerígenas más posibilidades de sobrevivir. De hecho, en todos los cultivos primarios de muestras tumorales obtenidas de pacientes con CCR donde se pudo determinar la expresión de NQO1 mediante Western blot, se detectaron niveles de expresión de NQO1 (datos no mostrados). Un estudio muy reciente sugiere que NQO1 es un biomarcador de respuesta a 17-AAG, y que podría ser utilizado para seleccionar pacientes que responderían bien a 17-AAG a concentraciones bajas [304]. Sin embargo, y a pesar de lo comentado, otros estudios ponen en duda si realmente es necesaria la expresión de NQO1 para que los inhibidores ansamicínicos sean activos como fármacos antitumorales. Por ejemplo, en un estudio realizado en células de CCR, no se encontraron grandes diferencias de citotoxicidad entre líneas celulares tratadas con GA, independientemente de si presentaban actividad de NQO1 o no [305]. Asimismo, en un trabajo llevado a cabo en un amplio panel de células de diferentes tipos de tumores se observó una correlación entre los niveles intracelulares de 17-AAGH₂/17-AAG y los niveles de NQO1 solamente en un grupo de células, y ambos parámetros presentaban una mala correlación con los efectos citotóxicos *in vitro* de IPI-504, un inhibidor derivado de la forma reducida de 17-AAG [198]. Estos autores distinguen entre dos subgrupos de células, unas en las que NQO1 participa en la reducción de 17-AAG y otras en las que esta reducción se produce en ausencia de NQO1. Ellos postulan que la

Discusión

bio-reducción de 17-AAG en este último caso podría estar mediada por otras enzimas reductasas que transfieren dos electrones al igual que NQO1, como NQO2 o xantina deshidrogenasa, o que transfieren un electrón, como NADPH:citocromo P450 reductasa.

En nuestro trabajo, cuando observamos los niveles de NQO1, encontramos que las líneas celulares de CP resistentes a 17-AAG, PANC-1 y CFPAC-1, carecen de expresión y de actividad NQO1, y que la línea celular de CCR Caco-2, considerada también resistente a 17-AAG, aunque responde mejor que las líneas celulares de CP, tampoco muestra expresión o actividad de NQO1 (Figura 70 y Tabla 30). Tanto en el caso de la línea celular PANC-1 como en la línea celular Caco-2, otros estudios han indicado que ambas presentan el polimorfismo NQO1*2, que conlleva a las células a una pérdida de expresión y actividad de NQO1 [266, 306], como también hemos detectado en nuestros experimentos. Sin embargo, el cultivo primario HCUVA-CC-34 que no responde bien a 17-AAG en los ensayos de proliferación, presenta niveles de expresión de NQO1. Por otro lado, las células LoVo, que responden de forma intermedia a 17-AAG, también carecen de expresión de NQO1 y su actividad es prácticamente nula, al contrario que otras líneas celulares analizadas más sensibles a 17-AAG, que muestran expresión y actividad de esta enzima. En esta línea celular, LoVo, es posible que otras enzimas reductasas, como las comentadas en el párrafo anterior, sean capaces de reducir a 17-AAG a su metabolito más activo, y por eso 17-AAG ejerza un efecto citotóxico mayor que en otras líneas carentes de NQO1. Otra hipótesis que explicaría este efecto sería que la inhibición sobre HSP90 de la forma no reducida de 17-AAG es suficiente para que estas células se vean afectadas por el tratamiento. Aun así, si estudiamos la relación entre la sensibilidad a 17-AAG y la actividad de NQO1, comparando los valores de IC_{50} para 17-AAG y la actividad de NQO1 en ocho líneas celulares, cuatro de CP y cuatro de CCR, se obtiene una correlación negativa significativa entre ambos parámetros (Figura 71, A); es decir, una mayor actividad de NQO1 está relacionada con una menor IC_{50} para 17-AAG. Por el contrario, cuando realizamos el mismo análisis para los valores de IC_{50} para NVP-AUY922 no vemos ninguna correlación. (Figura 71, B), sugiriendo así que este inhibidor, como ya suponíamos, no depende de la actividad de NQO1 para su acción antitumoral. La falta de correlación entre la actividad de NQO1 y otros inhibidores de

HSP90 como GA y radicol, también se ha descrito en otros estudios [299], e incluso, como ya hemos comentado, GA causa efectos antiproliferativos con independencia de la presencia de NQO1 [305]. Los resultados de nuestros experimentos sugieren que el posible vínculo entre la actividad de NQO1 y la sensibilidad a los inhibidores de HSP90 sólo ocurre con el inhibidor 17-AAG.

Aun así, sigue existiendo controversia alrededor del papel de NQO1 y la acción de 17-AAG, por lo que decidimos inhibir la actividad NQO1 en líneas celulares de nuestro panel de CP y CCR sensibles 17-AAG, con ES 936, un inhibidor específico de NQO1. Sin embargo, tras la inhibición farmacológica de NQO1, 17-AAG seguía provocando una disminución del crecimiento celular, comparable a la producida sin la inhibición de NQO1 en dos líneas celulares de CP (IMIM-PC-2 e IMIM-PC-1) (Figura 72). A continuación, realizamos ensayos de clonogenicidad a largo plazo, donde se puede valorar el efecto final de un fármaco, ya sea la recuperación de las células a la exposición a un tratamiento, o por el contrario, su muerte. Estos ensayos indican que 17-AAG reduce considerablemente el crecimiento celular de una línea celular de CCR (HT-29) (Figura 73). Además, observamos que el efecto antiproliferativo producido por 17-AAG se atenúa cuando es suministrado junto con ES 936, es decir, con la actividad de NQO1 inhibida, pero aun así la proliferación de las células disminuye a la mitad. En otros estudios llevados a cabo en diferentes líneas celulares, comprobaron que la utilización de ES 936 podía insensibilizar a las células hacia 17-AAG [193, 266]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la inhibición farmacológica de NQO1 producida por ES 936 no puede revertir totalmente la sensibilidad de las células a 17-AAG.

Por otro lado, Siegel y colaboradores [266] comprobaron que cuando la línea celular PANC-1, homocigota para el polimorfismo NQO1*2, eran transfectada con un vector de expresión para generar una línea derivada que expresara NQO1 de forma estable la acción de 17-AAG, tanto en el crecimiento como en la degradación de proteínas clientes, era mucho mayor que en las células sin transfectar. Este estudio sugiere que, al menos en esta línea celular, la presencia de NQO1 es un factor influyente en la acción de 17-AAG. Otro estudio mostró que líneas celulares de glioblastoma y de melanoma expuestas a concentraciones crecientes a 17-AAG

Discusión

adquirían resistencia a este inhibidor, y en ellas se producía una disminución de los niveles de expresión y de actividad de NQO1 [307]. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos que sería interesante silenciar la expresión de NQO1 en una línea celular sensible a 17-AAG para investigar si se revertía su sensibilidad a este inhibidor. Sin embargo, cuando la línea celular de CP, IMIM-PC-2, es transfectada para silenciar temporalmente la expresión genética de la enzima NQO1 (Figura 74, A y B), el fármaco 17-AAG es capaz de inhibir el crecimiento celular de manera significativa, tanto con actividad de NQO1, como sin ella (Figura 74, C), por lo que deducimos que la presencia de esta enzima no es necesaria para la actividad antiproliferativa de 17-AAG.

En general, los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que las líneas celulares de CP y de CCR con actividad de NQO1 son más sensibles al tratamiento con 17-AAG. Pero, y aunque NQO1 pueda contribuir a que 17-AAG sea más efectivo, su carencia en los ensayos experimentales *in vitro* realizados en algunas de las células incluidas en nuestro estudio, no induce resistencia a 17-AAG. Por ello, postulamos que la propia acción de 17-AAG sin su forma reducida más activa (17-AAGH₂), o la acción de otras enzimas que pueden reducir a 17-AAG sean al menos, en algunos casos, suficientes para que este inhibidor pueda realizar su acción antiproliferativa.

Por otro lado, otros factores se han propuesto como posibles mecanismos de resistencia a 17-AAG. Uno de ellos, es la inducción de chaperonas anti-apoptóticas como HSP70 o HSP27, que como hemos comentado en el apartado anterior, pueden frenar los efectos provocados por 17-AAG. Sin embargo, en las líneas celulares resistentes, los niveles de expresión de HSP70 (Figura 44) prácticamente no varían tras el tratamiento con 17-AAG. Otras posibilidades que podrían contribuir a la resistencia a los inhibidores de HSP90 incluyen mutaciones o alteraciones en la propia HSP90 de las células tumorales a tratar, aunque por el momento si se producen son desconocidas [308], o la dificultad de los inhibidores de HSP90 para acceder a las isoformas de HSP90 localizadas en los compartimentos celulares. Respecto a esto, ya se han descubierto nuevas moléculas que han conseguido inhibir selectivamente a la chaperona HSP90 localizada en las mitocondrias, causando la disminución del crecimiento tumoral *in vivo* y la muerte de células tumorales, por un mecanismo de acción basado en la

desestabilización del equilibrio mitocondrial y como consecuencia, la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis [309].

5. La inhibición de HSP90 en combinación con otros fármacos antitumorales

La terapia combinada es una opción terapéutica que cada vez está siendo más estudiada e incluida en numerosos ensayos clínicos, por las ventajas que puede presentar frente a la monoterapia, debido sobre todo a la heterogeneidad celular que presentan los tumores, que hace que no todas las células de un mismo tumor respondan de forma similar a un tratamiento. Los inhibidores de HSP90 también han sido combinados con diferentes tipos de fármacos antitumorales. Este tipo de combinación puede ser muy interesante por varios motivos. El primero estaría relacionado con el escaso éxito que han tenido algunos de estos fármacos en ensayos realizados en pacientes, como por ejemplo ha ocurrido con 17-AAG [185-187], pero por el contrario, cuando este mismo inhibidor fue administrado junto a otros fármacos, los resultados obtenidos fueron bastante esperanzadores y varios ejemplos han sido citados en el apartado 7.4 de la introducción [232-235, 240]. Otro motivo que hace de la administración de los inhibidores de HSP90 en acción conjunta con otros fármacos una terapia muy atractiva es el hecho de que pueden afectar a múltiples dianas relacionadas con sucesos de gran relevancia en la enfermedad tumoral simultáneamente [108, 119], por lo que pueden ayudar a otros tipos de fármacos a impedir que las células tumorales activen rutas alternativas o mecanismos de compensación para escapar del tratamiento. Por último, recordar que las chaperonas, incluida HSP90, son proteínas que se activan cuando las células reciben estímulos estresantes para ayudarlas a defenderse [69], por lo que la inhibición de las funciones de HSP90 puede desprotegerlas frente a agentes externos como los fármacos antitumorales.

El inhibidor NVP-AUY922 está siendo evaluado tanto en monoterapia como en combinación con otros fármacos en ensayos clínicos [231], y ha mostrado un gran efecto antitumoral en diferentes estudios preclínicos [226-230]. Dentro de nuestro estudio sobre la utilización de los inhibidores de HSP90 como fármacos antitumorales, pensamos que podría ser interesante valorar si el tratamiento de los inhibidores de

Discusión

HSP90 podría mejorar la susceptibilidad de líneas celulares de CP y de CRR a otros fármacos antitumorales a los que no han respondido bien, en experimentos *in vitro* previamente realizados por nuestro grupo de investigación. Para estos experimentos se decidió utilizar el inhibidor NVP-AUY922 y combinarlo con otros fármacos, ya que todas las líneas celulares estudiadas han mostrado sensibilidad a este inhibidor. Entre los fármacos a combinar con NVP-AUY922 se seleccionó gemcitabina (GEM), fármaco de referencia para el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas local o metastásico, desde que mostró una mejora de la supervivencia en comparación con 5FU [310], aunque muchos pacientes presentan quimioresistencia y no responden a su tratamiento. Además, también se pensó en este antineoplásico porque algunos estudios han demostrado que la combinación de GEM con otros fármacos citotóxicos produce un mayor beneficio terapéutico [311]. Otro de los fármacos estudiados para combinar con NVP-AUY922 fue oxaliplatino (OXA), un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento del CCR, y que también ha mostrado su eficacia contra el CCR avanzado en acción conjunta con diferentes agentes citotóxicos [312]. Ambos fármacos son agentes citotóxicos que impiden la síntesis del ADN, deteniendo el crecimiento de las células tumorales, y forman parte de las terapias convencionales usadas contra el cáncer. Sin embargo, hay que resaltar que algunas células tumorales presentan mecanismos de resistencia a ellos. En nuestro laboratorio, algunas de las líneas celulares estudiadas que no respondían bien a GEM o a OXA, fueron elegidas para ser combinadas con NVP-AUY922. Los resultados obtenidos tras la combinación con NVP-AUY922 revelan que la inhibición de HSP90 junto con GEM y OXA puede sensibilizar a células que, a priori, eran resistentes a estos fármacos (Figura 75, A, B y C). De forma similar a nuestros resultados, algunos estudios han demostrado que la combinación de NVP-AUY922 con otros fármacos antineoplásicos puede producir un efecto sinérgico o potenciador de la actividad antitumoral. Este es el caso de los resultados presentados en un modelo de células de cáncer gástrico tratados con NVP-AUY922 y los agentes quimioterápicos OXA y 5FU [272], compuestos utilizados en los tratamientos adyuvantes en el CCR, y también en el CP. Asimismo, otros estudios han determinado el incremento de la eficacia antitumoral de OXA con diferentes inhibidores de HSP90, como 17-AAG en ensayos *in vitro* [313], o 17-DMAG en ensayos *in vivo* [314], ambos en células de CCR. Hay que indicar que en los dos trabajos se diferenció entre líneas celulares con p53 funcional o

alterada, y este hecho es importante, ya que las mutaciones en p53, algo frecuente en células tumorales de CCR, puede interferir en la sensibilidad de las células a OXA, y en ambos casos, tanto en células con p53 funcional como en células con p53 mutada, los inhibidores de HSP90 mejoraron la eficacia de OXA. En nuestra investigación, la línea celular de CCR, HCT-15, descrita con un fenotipo p53 mutado, supera en parte la resistencia a OXA cuando es combinado con NVP-AUY922 (Figura 75, C).

Por otro lado, hay que recordar que algunos estudios que combinaban GEM con otros compuestos con una diana farmacológica específica, como los inhibidores de EGFR o de VEGF, no han dado resultados positivos en pacientes [27-29]. En nuestro caso, la combinación de NVP-AUY922 con GEM *in vitro* sí que da resultados positivos, ya que produce un efecto sinérgico en las líneas celulares de CP, PANC-1 y CFPAC-1, mejorando la escasa respuesta que estas líneas celulares presentan a GEM.

Además, también se estudió la combinación de NVP-AUY922 con dos fármacos que todavía no han sido aprobados para su uso en clínica y están en vías de desarrollo. Estos fármacos son Selumetinib o AZD6244 (AZD), un inhibidor específico de Mek 1/2, que forma parte de la ruta de señalización MAPK, y NVP-BEZ235 (BEZ), un inhibidor dual de las proteínas PI3-K y mTOR, que participan en la ruta PI3-K/Akt. Para ello, seleccionamos dos líneas celulares, una de CCR, DLD-1, y una de CP, PANC-1, resistentes a AZD o BEZ respectivamente, según los ensayos de proliferación preliminares realizados por nuestro grupo de investigación. En ambos casos, los resultados muestran un efecto sinérgico entre NVP-AUY922 y estos fármacos (Figura 75, D y E), por lo que, al igual que en los casos anteriores, la adición de NVP-AUY922 a AZD o BEZ acentúa los efectos antiproliferativos de estos fármacos cuando son suministrados como agentes únicos en nuestros modelos celulares. En un estudio realizado recientemente, también demostraron que la combinación de NVP-AUY922 con BEZ indujo efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos en células de colangiocarcinoma hepático [315]. Con el uso de ambos compuestos, la ruta PI3-K/Akt se veía alterada en diferentes puntos de la cascada e inhibida ampliamente. Por otro lado, los inhibidores de Mek 1/2 también se encuentran bajo estudio y forman parte de varios ensayos clínicos, por su capacidad de detener el crecimiento tumoral al inhibir la ruta MAPK. Algunos de estos inhibidores se han combinado 17-AAG y han mostrado que la inhibición conjunta de

Discusión

Mek 1/2 y de HSP90 induce un incremento de la muerte celular en células de CP y de hígado [316]. Estos resultados fueron obtenidos tanto en líneas celulares con KRAS mutado, como en células con mutaciones en BRAF o PI3KCA. Las células DLD-1, utilizadas en los ensayos de combinación con NVP-AUY922, poseen mutaciones en KRAS y PI3KCA y presentan resistencia a AZD asociada a altos niveles de fosforilación basal de las proteínas p70S6K y RPS6 [317]. Esta línea celular tras el tratamiento conjunto de NVP-AUY922 con AZD consigue superar esta resistencia intrínseca según nuestros resultados experimentales.

Alteraciones tanto en la ruta de PI3-k/Akt como en la de MAPK, como hemos ido comentando a lo largo de todo el trabajo, pueden tener una gran relevancia para combatir la progresión tumoral, ya que la sobreactivación de estas vías es frecuente en las células tumorales, y por tanto, la eliminación de un mayor número de dianas moleculares con la utilización conjunta de los inhibidores de HSP90 y otros fármacos que afectan a estas rutas de señalización, podría aumentar la susceptibilidad de las líneas celulares analizadas a dichos fármacos.

Además, hay que recordar que NVP-AUY922 fue suministrado a concentraciones en un rango nanomolar, lo que podría constituir una ventaja farmacológica, ya que muchas veces las dosis necesarias para obtener un beneficio terapéutico son tan altas que implicarían una grave toxicidad, por lo que limitan la acción de los agentes antitumorales en clínica. Por todo ello, los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que el empleo del inhibidor de HSP90, NVP-AUY922, tiene un gran potencial como fármaco para ser utilizado en combinación con diferentes fármacos antitumorales, incluso cuando estos compuestos no son muy eficaces cuando se han usado como agentes únicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las características específicas de las células tumorales pueden influir en la eficiencia de las combinaciones farmacológicas y por tanto, debe ser valoradas para caso o tipo de tumor.





Conclusiones

1. La inhibición de la actividad de HSP90 mediada por 17-AAG reduce la proliferación celular de la mayoría de las líneas celulares de cáncer de páncreas exocrino y de carcinoma colorrectal, a excepción de las líneas celulares PANC-1, CFPAC-1 y Caco-2, que responden muy levemente o son resistentes a este fármaco. En cambio, el inhibidor NVP-AUY922 provoca una reducción de la proliferación celular de todas las líneas celulares de cáncer de páncreas exocrino y de carcinoma colorrectal estudiadas, y de forma más efectiva que 17-AAG.
2. La inhibición de la actividad de HSP90 producida por 17-AAG y NVP-AUY922 produce una disminución de la proliferación celular de los cultivos primarios procedentes de muestras tumorales de pacientes de carcinoma colorrectal. En concreto, los cultivos HCUVA-CC-1, HCUVA-CC-1^{CT} y HCUVA-CC-3^{CT} sufren una considerable disminución de su proliferación tras el tratamiento con 17-AAG o NVP-AUY922, mientras que el cultivo HCUVA-CC-34 responde de forma más leve.
3. Ambos inhibidores disminuyen la formación de colonias en un lecho de agar blando en todas las líneas celulares de cáncer de páncreas exocrino y de carcinoma colorrectal estudiadas, a excepción de las líneas celulares PANC-1, CFPAC-1 y Caco-2, en las que hay una leve o prácticamente nula reducción de la formación de colonias tras los tratamientos. Estos inhibidores también reducen la formación de colonias en los cultivos primarios estudiados, siendo el cultivo HCUVA-CC-34 el que presenta una menor disminución en el número de colonias formadas.
4. La utilización de 17-AAG y NVP-AUY922 causa una reducción en los niveles de expresión de proteínas clientes de HSP90 que participan en las rutas de señalización PI3-K/Akt y MAPK, como los receptores HER o la serina/treonina quinasa Akt, y del estado de fosforilación de proteínas relacionadas con estas rutas, como Erk 1/2 o RPS6, en las líneas celulares y los cultivos primarios que responden a los efectos antiproliferativos de dichos inhibidores. En la línea celular de cáncer de páncreas exocrino IMIM-PC-2, el tratamiento de ambos inhibidores produce una disminución en el estado de fosforilación de Akt, p70S6K y RSK1, todas ellas proteínas clientes de HSP90. Además, la exposición a 17-AAG y NVP-

Conclusiones

AUY922 provoca un incremento de la expresión de la chaperona HSP70, sello de identidad de la inhibición de HSP90, en las líneas celulares y cultivos primarios que son sensibles a estos inhibidores. Por el contrario, las células que no responden bien a dichos inhibidores presentan una disminución de la expresión de proteínas clientes de HSP90 mucho más leve o nula, y no experimentan un gran incremento en la expresión de HSP70.

5. La inhibición de la proliferación por parte de 17-AAG y NVP-AUY922 va acompañada de una acumulación de las células en diferentes fases del ciclo celular y/o un incremento de la fase SubG₁, indicativo de muerte celular, en las líneas celulares y cultivos primarios que responden a estos inhibidores. En todas las líneas celulares analizadas que experimentan cambios tras el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 se produce una acumulación de las células en la fase G₂/M del ciclo celular, a excepción de la línea IMIM-PC-2 en la que 17-AAG produce una acumulación de las células en la fase G₁ del ciclo celular, y en la línea LoVo, en la que tanto 17-AAG como NVP-AUY922 producen un incremento de la fase SubG₁ que no va precedido de una acumulación de las células en ninguna fase del ciclo celular. En los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3^{CT} el tratamiento con 17-AAG y NVP-AUY922 produce una acumulación de las células en la fase G₂/M del ciclo celular.
6. Las líneas celulares IMIM-PC-1, CFPAC-1 y Caco-2 y el cultivo primario HCUVA-CC-1 experimentan tras el tratamiento con 17-AAG y/o NVP-AUY922 una acumulación en la fase G₂/M del ciclo celular que va acompañada por una inducción de la fosforilación de la Histona 3 (Ser10 y Ser28), indicativo de un incremento del proceso mitótico, y la formación de núcleos mitóticos irregulares o aberrantes.
7. El inhibidor NVP-AUY922 provoca una notable reducción en los niveles de expresión y de fosforilación de la proteína cliente de HSP90 Cdc2, tanto en las líneas celulares CFPAC-1 y Caco-2, como en los cultivos primarios HCUVA-CC-1 y HCUVA-CC-3^{CT}, por lo que se deduce que la transición de las células desde la fase G₂ del ciclo celular hacia la fase de mitosis está alterada tras la inhibición de HSP90.

8. El aumento de la fase SubG₁, indicativo de muerte celular producido por 17-AAG y NVP-AUY922 en la línea celular IMIM-PC-2 parece ser mediado por una vía de muerte celular apoptótica. El inhibidor NVP-AUY922 también induce un aumento de la fase SubG₁ en la línea celular CFPAC-1, aunque en este caso las células parecen sometidas a una muerte celular por catástrofe mitótica o necrótica, o una combinación de ambas.
9. Los transportadores ABC analizados (Mdr-1, MRP1 y BCRP1) no están involucrados en la resistencia al inhibidor de HSP90 17-AAG en las líneas celulares de cáncer de páncreas exocrino PANC-1 y CFPAC-1, ni en la línea celular de carcinoma colorrectal Caco-2.
10. La actividad de la enzima NQO1 se correlaciona con una mayor susceptibilidad de las líneas celulares IMIM-PC-2, IMIM-PC-1, HT-29 y SW620 al tratamiento con 17-AAG. Sin embargo, tras la eliminación de la actividad de NQO1 en las líneas celulares IMIM-PC-2 y HT-29 el inhibidor 17-AAG sigue produciendo en efecto antiproliferativo en ambas líneas celulares. En el caso del inhibidor NVP-AUY922, no existe relación alguna entre la sensibilidad de las líneas celulares de cáncer de páncreas exocrino y de carcinoma colorrectal analizadas y la actividad de NQO1.
11. La combinación de NVP-AUY922 a una concentración sub-óptima con otros fármacos antitumorales, como gemcitabina, oxaliplatino, AZD6244 y NVP-BEZ235, es capaz de incrementar el efecto antiproliferativo de estos fármacos en líneas celulares de cáncer de páncreas exocrino y de carcinoma colorrectal, que previamente habían mostrado una baja respuesta o resistencia al tratamiento con dichos fármacos.





Bibliografía

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.: **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11**. In: [Internet] <http://globocan.iarc.fr> accessed on 17/01/2014.
2. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, López-Abente G: **Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007**. *Ann Oncol* 2010, **21** Suppl 3:iii14-20.
3. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J: **Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008**. *Int J Cancer* 2013, **132**(5):1133-1145.
4. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R: **EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary**. *Eur J Cancer* 2009, **45**(6):931-991.
5. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, Santaquilani M: **Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE-4 study**. *Lancet Oncol* 2007, **8**(9):773-783.
6. Fitzgerald TL, Hickner ZJ, Schmitz M, Kort EJ: **Changing incidence of pancreatic neoplasms: a 16-year review of statewide tumor registry**. *Pancreas* 2008, **37**(2):134-138.
7. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS: **Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database**. *Cancer* 2007, **110**(4):738-744.
8. Soriano-Izquierdo A, Adet AC, Gallego R, Miquel R, Castells A, Pellise M, Nadal C, Lopez-Boado MA, Pique JM, Gascon P *et al*: **[Prediction of prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma with curative intent resection by means of histologic grade and pathologic N stage]**. *Med Clin (Barc)* 2009, **132**(5):163-171.
9. Hidalgo M: **Pancreatic cancer**. *N Engl J Med* 2010, **362**(17):1605-1617.
10. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: **Cancer statistics, 2014**. *CA Cancer J Clin* 2014, **64**(1):9-29.
11. Brennan MF, Moccia RD, Klimstra D: **Management of adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas**. *Ann Surg* 1996, **223**(5):506-511; discussion 511-502.
12. Oberg K, Eriksson B: **Endocrine tumours of the pancreas**. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005, **19**(5):753-781.
13. Wormann SM, Algul H: **Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer**. *Front Oncol* 2013, **3**:282.
14. Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC: **Inherited pancreatic cancer syndromes**. *Cancer J* 2012, **18**(6):485-491.
15. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA *et al*: **BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma**. *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**(3):214-221.

Bibliografía

16. Iacobuzio-Donahue CA, Velculescu VE, Wolfgang CL, Hruban RH: **Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(16):4257-4265.
17. Gospodarowicz MK, Miller D, Groome PA, Greene FL, Logan PA, Sobin LH: **The process for continuous improvement of the TNM classification.** *Cancer* 2004, **100**(1):1-5.
18. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M: **Pancreatic cancer.** *Lancet* 2011, **378**(9791):607-620.
19. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS *et al*: **Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions.** *Am J Surg Pathol* 2001, **25**(5):579-586.
20. Ranganathan P, Harsha HC, Pandey A: **Molecular alterations in exocrine neoplasms of the pancreas.** *Arch Pathol Lab Med* 2009, **133**(3):405-412.
21. Soto JL, Barbera VM, Saceda M, Carrato A: **Molecular biology of exocrine pancreatic cancer.** *Clin Transl Oncol* 2006, **8**(5):306-312.
22. Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M: **Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2000, **60**(7):1835-1839.
23. Helmstaedter L, Riemann JF: **Pancreatic cancer--EUS and early diagnosis.** *Langenbecks Arch Surg* 2008, **393**(6):923-927.
24. Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM: **Pancreatic cancer: basic and clinical aspects.** *Gastroenterology* 2005, **128**(6):1606-1625.
25. Van den Broeck A, Sergeant G, Ectors N, Van Steenberghe W, Aerts R, Topal B: **Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Eur J Surg Oncol* 2009, **35**(6):600-604.
26. Valsecchi ME, Diaz-Canton E, de la Vega M, Littman SJ: **Recent Treatment Advances and Novel Therapies in Pancreas Cancer: A Review.** *J Gastrointest Cancer* 2013.
27. Fensterer H, Schade-Brittinger C, Muller HH, Tebbe S, Fass J, Lindig U, Settmacher U, Schmidt WE, Marten A, Ebert MP *et al*: **Multicenter phase II trial to investigate safety and efficacy of gemcitabine combined with cetuximab as adjuvant therapy in pancreatic cancer (ATIP).** *Ann Oncol* 2013, **24**(10):2576-2581.
28. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, Innocenti F, Mulcahy MF, O'Reilly E, Wozniak TF *et al*: **Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303).** *J Clin Oncol* 2010, **28**(22):3617-3622.
29. Kindler HL, Ioka T, Richel DJ, Bennouna J, Letourneau R, Okusaka T, Funakoshi A, Furuse J, Park YS, Ohkawa S *et al*: **Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study.** *Lancet Oncol* 2011, **12**(3):256-262.

30. Xu CP, Xue XJ, Liang N, Xu DG, Liu FJ, Yu XS, Zhang JD: **Effect of chemoradiotherapy and neoadjuvant chemoradiotherapy in resectable pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2013.
31. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde C, Friess H, Kleeff J: **Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages.** *PLoS Med* 2010, **7(4)**:e1000267.
32. Salman B, Zhou D, Jaffee EM, Edil BH, Zheng L: **Vaccine therapy for pancreatic cancer.** *Oncoimmunology* 2013, **2(12)**:e26662.
33. Brenner H, Bouvier AM, Foschi R, Hackl M, Larsen IK, Lemmens V, Mangone L, Francisci S: **Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study.** *Int J Cancer* 2012, **131(7)**:1649-1658.
34. Winawer SJ: **Natural history of colorectal cancer.** *Am J Med* 1999, **106(1A)**:3S-6S; discussion 50S-51S.
35. Obrand DI, Gordon PH: **Continued change in the distribution of colorectal carcinoma.** *Br J Surg* 1998, **85(2)**:246-248.
36. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW: **Hereditary and familial colon cancer.** *Gastroenterology* 2010, **138(6)**:2044-2058.
37. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberger D, Brooks D, Creasman W, Cohen C, Runowicz C *et al*: **American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection.** *CA Cancer J Clin* 2001, **51(1)**:38-75; quiz 77-80.
38. Brenner H, Kloor M, Pox CP: **Colorectal cancer.** *Lancet* 2013.
39. McKeown E, Nelson DW, Johnson EK, Maykel JA, Stojadinovic A, Nissan A, Avital I, Brucher BL, Steele SR: **Current Approaches and Challenges for Monitoring Treatment Response in Colon and Rectal Cancer.** *J Cancer* 2014, **5(1)**:31-43.
40. Johnston PG, Allegra CJ: **Colorectal cancer biology: clinical implications.** *Semin Oncol* 1995, **22(5)**:418-432.
41. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA: **Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90(9)**:675-684.
42. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V: **The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges.** *Histopathology* 2013, **62(3)**:367-386.
43. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C: **The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3(9)**:695-701.
44. Heinimann K: **Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of Microsatellite Instability Status.** *Front Oncol* 2013, **3**:272.

Bibliografía

45. Jung SB, Lee HI, Oh HK, Shin IH, Jeon CH: **Clinico-pathologic Parameters for Prediction of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer.** *Cancer Res Treat* 2012, **44**(3):179-186.
46. Compton CC, Greene FL: **The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond.** *CA Cancer J Clin* 2004, **54**(6):295-308.
47. Jackson TD, Kaplan GG, Arena G, Page JH, Rogers SO, Jr.: **Laparoscopic versus open resection for colorectal cancer: a metaanalysis of oncologic outcomes.** *J Am Coll Surg* 2007, **204**(3):439-446.
48. Manchon Walsh P, Borrás JM, Ferro T, Espinas JA: **Colorectal Cancer OncoGuía.** *Clin Transl Oncol* 2010, **12**(3):188-210.
49. Figueredo A, Coombes ME, Mukherjee S: **Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer.** *Cochrane Database Syst Rev* 2008(3):CD005390.
50. Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F *et al*: **Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(19):3109-3116.
51. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ: **Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(11):1465-1471.
52. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, Wolmark N: **Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(28):3768-3774.
53. Papadimitriou CA, Papakostas P, Karina M, Malettou L, Dimopoulos MA, Pentheroudakis G, Samantas E, Bamias A, Miliaras D, Basdanis G *et al*: **A randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with irinotecan, leucovorin and fluorouracil versus leucovorin and fluorouracil for stage II and III colon cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group study.** *BMC Med* 2011, **9**:10.
54. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Topham C, Tabernero J, Andre T, Sobrero AF *et al*: **Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(19):3117-3125.
55. Sobrero A, Frassinetti G, Falcone A, Dogliotti L, Rosso R, Di Costanzo F, Bruzzi P: **Adjuvant sequential methotrexate --> 5-fluorouracil vs 5-fluorouracil plus leucovorin in radically resected stage III and high-risk stage II colon cancer.** *Br J Cancer* 2005, **92**(1):24-29.
56. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, Cunningham D, Cartwright TH, Hecht JR, Rivera F *et al*: **Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial.** *Lancet Oncol* 2012, **13**(12):1225-1233.

57. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, Smyrk TC, Sinicrope FA, Chan E, Gill S *et al*: **Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial.** *JAMA* 2012, **307**(13):1383-1393.
58. Jaeck D, Bachellier P, Guiguet M, Boudjema K, Vaillant JC, Balladur P, Nordlinger B: **Long-term survival following resection of colorectal hepatic metastases.** *Association Francaise de Chirurgie. Br J Surg* 1997, **84**(7):977-980.
59. Renaud S, Alifano M, Falcoz PE, Magdeleinat P, Santelmo N, Pages O, Massard G, Regnard JF: **Does nodal status influence survival? Results of a 19-year systematic lymphadenectomy experience during lung metastasectomy of colorectal cancer.** *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014.
60. de Mello RA, Marques AM, Araujo A: **Epidermal growth factor receptor and metastatic colorectal cancer: insights into target therapies.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**(38):6315-6318.
61. Hurwitz HI, Tebbutt NC, Kabbinavar F, Giantonio BJ, Guan ZZ, Mitchell L, Waterkamp D, Tabernero J: **Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials.** *Oncologist* 2013, **18**(9):1004-1012.
62. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouche O, Mineur L, Barone C *et al*: **Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial.** *Lancet* 2013, **381**(9863):303-312.
63. Nagtegaal ID, Quirke P: **What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer?** *J Clin Oncol* 2008, **26**(2):303-312.
64. Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, Wilking N: **The Stockholm I trial of preoperative short term radiotherapy in operable rectal carcinoma. A prospective randomized trial.** *Stockholm Colorectal Cancer Study Group. Cancer* 1995, **75**(9):2269-2275.
65. Gerard A, Buyse M, Nordlinger B, Loygue J, Pene F, Kempf P, Bosset JF, Gignoux M, Arnaud JP, Desai C *et al*: **Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Final results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).** *Ann Surg* 1988, **208**(5):606-614.
66. **Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial.** *N Engl J Med* 1997, **336**(14):980-987.
67. Glimelius B: **Neo-adjuvant radiotherapy in rectal cancer.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**(46):8489-8501.
68. Ritossa P: **[Problems of prophylactic vaccinations of infants].** *Riv Ist Sieroter Ital* 1962, **37**:79-108.
69. Morimoto RI: **Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.** *Science* 1993, **259**(5100):1409-1410.
70. Ellis J: **Proteins as molecular chaperones.** *Nature* 1987, **328**(6129):378-379.

Bibliografia

71. Bagatell R, Whitesell L: **Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity.** *Mol Cancer Ther* 2004, **3**(8):1021-1030.
72. Smith DF, Whitesell L, Katsanis E: **Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention.** *Pharmacol Rev* 1998, **50**(4):493-514.
73. Whitesell L, Lindquist SL: **HSP90 and the chaperoning of cancer.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(10):761-772.
74. Ralhan R, Kaur J: **Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix.** *Clin Cancer Res* 1995, **1**(10):1217-1222.
75. Chant ID, Rose PE, Morris AG: **Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry.** *Br J Haematol* 1995, **90**(1):163-168.
76. Santarosa M, Favaro D, Quaia M, Galligioni E: **Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients.** *Eur J Cancer* 1997, **33**(6):873-877.
77. Thomas X, Campos L, Mounier C, Cornillon J, Flandrin P, Le QH, Piselli S, Guyotat D: **Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia.** *Leuk Res* 2005, **29**(9):1049-1058.
78. Whitesell L, Bagatell R, Falsey R: **The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors.** *Curr Cancer Drug Targets* 2003, **3**(5):349-358.
79. Mosser DD, Morimoto RI: **Molecular chaperones and the stress of oncogenesis.** *Oncogene* 2004, **23**(16):2907-2918.
80. Lai BT, Chin NW, Stanek AE, Keh W, Lanks KW: **Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies.** *Mol Cell Biol* 1984, **4**(12):2802-2810.
81. Picard D: **Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(10):1640-1648.
82. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF: **Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance.** *FEBS Lett* 2004, **562**(1-3):11-15.
83. Taherian A, Krone PH, Ovsenek N: **A comparison of Hsp90alpha and Hsp90beta interactions with cochaperones and substrates.** *Biochem Cell Biol* 2008, **86**(1):37-45.
84. Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Siganou A, Schweinfest CW, Watson DK, Raptis L: **The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation.** *J Biol Chem* 2002, **277**(10):8312-8320.
85. Zurawska A, Urbanski J, Bieganowski P: **Hsp90n - An accidental product of a fortuitous chromosomal translocation rather than a regular Hsp90 family member of human proteome.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1784**(11):1844-1846.
86. Marzec M, Eletto D, Argon Y: **GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1823**(3):774-787.

87. Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, Toft DO: **The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties.** *J Biol Chem* 2000, **275**(5):3305-3312.
88. Matassa DS, Amoroso MR, Maddalena F, Landriscina M, Esposito F: **New insights into TRAP1 pathway.** *Am J Cancer Res* 2012, **2**(2):235-248.
89. Pearl LH, Prodromou C: **Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone.** *Adv Protein Chem* 2001, **59**:157-186.
90. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU: **In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis.** *J Cell Biol* 1998, **143**(4):901-910.
91. Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, Barbier P, Leclerc-Devin J, Millot JM, Briand C, Makarov AA, Catelli MG, Peyrot V: **Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain.** *J Biol Chem* 2002, **277**(14):12208-12214.
92. Scheibel T, Weikl T, Buchner J: **Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(4):1495-1499.
93. Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH: **Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions.** *Mol Cell* 2003, **11**(3):647-658.
94. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH: **The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains.** *EMBO J* 2000, **19**(16):4383-4392.
95. Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Jalsovszky G, Holly S, Kahn CR, Gergely P, Jr., Soti C, Mihaly K, Somogyi J: **ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90).** *J Biol Chem* 1993, **268**(3):1901-1907.
96. Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES, Litwack G, Toft D: **Nucleotides and two functional states of hsp90.** *J Biol Chem* 1997, **272**(12):8007-8012.
97. Pearl LH, Prodromou C, Workman P: **The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment.** *Biochem J* 2008, **410**(3):439-453.
98. Powers MV, Clarke PA, Workman P: **Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both?** *Cell Cycle* 2009, **8**(4):518-526.
99. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R *et al*: **Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1.** *Mol Cell* 2002, **10**(6):1307-1318.
100. Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM: **Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone.** *J Biol Chem* 2003, **278**(19):17228-17235.

Bibliografia

101. Sullivan WP, Owen BA, Toft DO: **The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90.** *J Biol Chem* 2002, **277**(48):45942-45948.
102. Cyr DM, Langer T, Douglas MG: **DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70.** *Trends Biochem Sci* 1994, **19**(4):176-181.
103. Suh WC, Burkholder WF, Lu CZ, Zhao X, Gottesman ME, Gross CA: **Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(26):15223-15228.
104. Chen S, Smith DF: **Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery.** *J Biol Chem* 1998, **273**(52):35194-35200.
105. Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH: **The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37).** *Cell* 2004, **116**(1):87-98.
106. Pratt WB, Toft DO: **Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.** *Endocr Rev* 1997, **18**(3):306-360.
107. Isaacs JS, Xu W, Neckers L: **Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics.** *Cancer Cell* 2003, **3**(3):213-217.
108. Powers MV, Workman P: **Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13** Suppl 1:S125-135.
109. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C: **The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(1):93-96.
110. Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmegern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, Hartl FU: **Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(25):14536-14541.
111. Pratt WB: **The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1998, **217**(4):420-434.
112. Morimoto RI: **Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones.** *Cell* 2002, **110**(3):281-284.
113. Pick E, Kluger Y, Giltzane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM: **High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer.** *Cancer Res* 2007, **67**(7):2932-2937.
114. Li CF, Huang WW, Wu JM, Yu SC, Hu TH, Uen YH, Tian YF, Lin CN, Lu D, Fang FM *et al*: **Heat shock protein 90 overexpression independently predicts inferior disease-free survival with differential expression of the alpha and beta isoforms in gastrointestinal stromal tumors.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(23):7822-7831.
115. McCarthy MM, Pick E, Kluger Y, Gould-Rothberg B, Lazova R, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM: **HSP90 as a marker of progression in melanoma.** *Ann Oncol* 2008, **19**(3):590-594.

116. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ: **A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors.** *Nature* 2003, **425**(6956):407-410.
117. Barrott JJ, Haystead TA: **Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer.** *FEBS J* 2013, **280**(6):1381-1396.
118. Weinstein IB, Joe AK: **Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy.** *Nat Clin Pract Oncol* 2006, **3**(8):448-457.
119. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
120. Perona R: **Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors.** *Clin Transl Oncol* 2006, **8**(2):77-82.
121. Yarden Y: **The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities.** *Eur J Cancer* 2001, **37 Suppl 4**:S3-8.
122. Cantley LC: **The phosphoinositide 3-kinase pathway.** *Science* 2002, **296**(5573):1655-1657.
123. Sen P, Mukherjee S, Ray D, Raha S: **Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes.** *Mol Cell Biochem* 2003, **253**(1-2):241-246.
124. Wang X, Proud CG: **The mTOR pathway in the control of protein synthesis.** *Physiology (Bethesda)* 2006, **21**:362-369.
125. Isotani S, Hara K, Tokunaga C, Inoue H, Avruch J, Yonezawa K: **Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro.** *J Biol Chem* 1999, **274**(48):34493-34498.
126. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M: **Clinical relevance of KRAS in human cancers.** *J Biomed Biotechnol* 2010, **2010**:150960.
127. Yoon S, Seger R: **The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.** *Growth Factors* 2006, **24**(1):21-44.
128. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J *et al*: **Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.** *Oncogene* 1999, **18**(3):813-822.
129. Hill MM, Hemmings BA: **Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy.** *Pharmacol Ther* 2002, **93**(2-3):243-251.
130. Brand TM, Wheeler DL: **KRAS mutant colorectal tumors: past and present.** *Small GTPases* 2012, **3**(1):34-39.
131. Fearon ER: **Molecular genetics of colorectal cancer.** *Annu Rev Pathol* 2011, **6**:479-507.
132. Schultz NA, Roslind A, Christensen IJ, Horn T, Hogdall E, Pedersen LN, Kruhoffer M, Burcharth F, Wojdemann M, Johansen JS: **Frequencies and prognostic role of KRAS and BRAF mutations in patients with localized pancreatic and ampullary adenocarcinomas.** *Pancreas* 2012, **41**(5):759-766.

Bibliografia

133. Harari PM: **Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology.** *Endocr Relat Cancer* 2004, **11**(4):689-708.
134. Collins MA, Pasca di Magliano M: **Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer.** *Front Physiol* 2013, **4**:407.
135. Zenonos K, Kyprianou K: **RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer.** *World J Gastrointest Oncol* 2013, **5**(5):97-101.
136. Pardee AB: **G1 events and regulation of cell proliferation.** *Science* 1989, **246**(4930):603-608.
137. Schafer KA: **The cell cycle: a review.** *Vet Pathol* 1998, **35**(6):461-478.
138. Meyerson M, Harlow E: **Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**(3):2077-2086.
139. Dulic V, Lees E, Reed SI: **Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase.** *Science* 1992, **257**(5078):1958-1961.
140. Pavletich NP: **Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk5, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors.** *J Mol Biol* 1999, **287**(5):821-828.
141. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ: **Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4.** *Genes Dev* 1993, **7**(3):331-342.
142. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B: **p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells.** *Cancer Res* 1995, **55**(22):5187-5190.
143. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**(4):239-257.
144. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: **Cell death: the significance of apoptosis.** *Int Rev Cytol* 1980, **68**:251-306.
145. Golstein P, Kroemer G: **Cell death by necrosis: towards a molecular definition.** *Trends Biochem Sci* 2007, **32**(1):37-43.
146. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR *et al*: **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(1):3-11.
147. Wu W, Liu P, Li J: **Necroptosis: an emerging form of programmed cell death.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2012, **82**(3):249-258.
148. Baehrecke EH: **Autophagy: dual roles in life and death?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(6):505-510.
149. Mansilla S, Bataller M, Portugal J: **Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy.** *Anticancer Agents Med Chem* 2006, **6**(6):589-602.
150. Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G: **MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells.** *Am J Physiol* 1999, **277**(4 Pt 1):C652-664.

151. Liang J, Slingerland JM: **Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.** *Cell Cycle* 2003, **2**(4):339-345.
152. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ: **Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(35):5552-5564.
153. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N: **The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.** *Genes Dev* 1997, **11**(6):701-713.
154. de Toro G: **Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular.** In: *VIII Congreso Hispanoamericano de Anatomía Patológica Virtual*. vol. Conferencias invitadas: Alcorcón: Universidad Rey Juan Carlos, 2006; 2006.
155. Burrows F, Zhang H, Kamal A: **Hsp90 activation and cell cycle regulation.** *Cell Cycle* 2004, **3**(12):1530-1536.
156. Malinowsky K, Wolff C, Gundisch S, Berg D, Becker K: **Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues.** *J Cancer* 2010, **2**:26-35.
157. Porter JR, Fritz CC, Depew KM: **Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy.** *Curr Opin Chem Biol* 2010, **14**(3):412-420.
158. Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G: **Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1823**(3):742-755.
159. Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM: **The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone.** *J Biol Chem* 2000, **275**(47):37181-37186.
160. Itoh H, Ogura M, Komatsuda A, Wakui H, Miura AB, Tashima Y: **A novel chaperone-activity-reducing mechanism of the 90-kDa molecular chaperone HSP90.** *Biochem J* 1999, **343 Pt 3**:697-703.
161. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM: **Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(18):8324-8328.
162. DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH: **Geldanamycin, a new antibiotic.** *J Antibiot (Tokyo)* 1970, **23**(9):442-447.
163. Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Krutzsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E *et al*: **The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation.** *J Biol Chem* 1997, **272**(38):23843-23850.
164. Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP: **Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent.** *Cell* 1997, **89**(2):239-250.

Bibliografia

165. An WG, Schnur RC, Neckers L, Blagosklonny MV: **Depletion of p185erbB2, Raf-1 and mutant p53 proteins by geldanamycin derivatives correlates with antiproliferative activity.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1997, **40**(1):60-64.
166. Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L: **Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1995, **36**(4):305-315.
167. Hollingshead M, Alley M, Burger AM, Borgel S, Pacula-Cox C, Fiebig HH, Sausville EA: **In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, **56**(2):115-125.
168. Lancet JE, Gojo I, Burton M, Quinn M, Tighe SM, Kersey K, Zhong Z, Albitar MX, Bhalla K, Hannah AL *et al*: **Phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) administered intravenously twice weekly to patients with acute myeloid leukemia.** *Leukemia* 2010, **24**(4):699-705.
169. Glaze ER, Lambert AL, Smith AC, Page JG, Johnson WD, McCormick DL, Brown AP, Levine BS, Covey JM, Egorin MJ *et al*: **Preclinical toxicity of a geldanamycin analog, 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), in rats and dogs: potential clinical relevance.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, **56**(6):637-647.
170. Egorin MJ, Zuhowski EG, Rosen DM, Sentz DL, Covey JM, Eiseman JL: **Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) in CD2F1 mice¹.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2001, **47**(4):291-302.
171. Floris G, Sciot R, Wozniak A, Van Looy T, Wellens J, Faa G, Normant E, Debiec-Rychter M, Schoffski P: **The Novel HSP90 inhibitor, IPI-493, is highly effective in human gastrointestinal stromal tumor xenografts carrying heterogeneous KIT mutations.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(17):5604-5614.
172. Hanson BE, Vesole DH: **Retaspimycin hydrochloride (IPI-504): a novel heat shock protein inhibitor as an anticancer agent.** *Expert Opin Investig Drugs* 2009, **18**(9):1375-1383.
173. Wagner AJ, Chugh R, Rosen LS, Morgan JA, George S, Gordon M, Dunbar J, Normant E, Grayzel D, Demetri GD: **A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(21):6020-6029.
174. Siegel D, Jagannath S, Vesole DH, Borello I, Mazumder A, Mitsiades C, Goddard J, Dunbar J, Normant E, Adams J *et al*: **A phase 1 study of IPI-504 (retaspimycin hydrochloride) in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma.** *Leuk Lymphoma* 2011, **52**(12):2308-2315.
175. Sequist LV, Gettinger S, Senzer NN, Martins RG, Janne PA, Lilenbaum R, Gray JE, Iafrate AJ, Katayama R, Hafeez N *et al*: **Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(33):4953-4960.

176. Modi S, Saura C, Henderson C, Lin NU, Mahtani R, Goddard J, Rodenas E, Hudis C, O'Shaughnessy J, Baselga J: **A multicenter trial evaluating retaspimycin HCL (IPI-504) plus trastuzumab in patients with advanced or metastatic HER2-positive breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2013, **139**(1):107-113.
177. Oh WK, Galsky MD, Stadler WM, Srinivas S, Chu F, Bubley G, Goddard J, Dunbar J, Ross RW: **Multicenter phase II trial of the heat shock protein 90 inhibitor, retaspimycin hydrochloride (IPI-504), in patients with castration-resistant prostate cancer.** *Urology* 2011, **78**(3):626-630.
178. Williams CR, Tabios R, Linehan WM, Neckers L: **Intratumor injection of the Hsp90 inhibitor 17AAG decreases tumor growth and induces apoptosis in a prostate cancer xenograft model.** *J Urol* 2007, **178**(4 Pt 1):1528-1532.
179. Bonvini P, Gastaldi T, Falini B, Rosolen A: **Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK), a novel Hsp90-client tyrosine kinase: down-regulation of NPM-ALK expression and tyrosine phosphorylation in ALK(+) CD30(+) lymphoma cells by the Hsp90 antagonist 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin.** *Cancer Res* 2002, **62**(5):1559-1566.
180. George P, Bali P, Cohen P, Tao J, Guo F, Sigua C, Vishvanath A, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S *et al*: **Cotreatment with 17-allylamino-demethoxygeldanamycin and FLT-3 kinase inhibitor PKC412 is highly effective against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3.** *Cancer Res* 2004, **64**(10):3645-3652.
181. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Kung AL, Davies FE, Morgan G, Akiyama M, Shringarpure R, Munshi NC *et al*: **Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition.** *Blood* 2006, **107**(3):1092-1100.
182. Schwock J, Pham NA, Cao MP, Hedley DW: **Efficacy of Hsp90 inhibition for induction of apoptosis and inhibition of growth in cervical carcinoma cells in vitro and in vivo.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2008, **61**(4):669-681.
183. Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mascarelli F: **17-AAG and 17-DMAG-induced inhibition of cell proliferation through B-Raf downregulation in WT B-Raf-expressing uveal melanoma cell lines.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**(6):2348-2356.
184. Kim YS, Alarcon SV, Lee S, Lee MJ, Giaccone G, Neckers L, Trepel JB: **Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial.** *Curr Top Med Chem* 2009, **9**(15):1479-1492.
185. Solit DB, Osman I, Polsky D, Panageas KS, Daud A, Goydos JS, Teitcher J, Wolchok JD, Germino FJ, Krown SE *et al*: **Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(24):8302-8307.
186. Ronnen EA, Kondagunta GV, Ishill N, Sweeney SM, Deluca JK, Schwartz L, Bacik J, Motzer RJ: **A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma.** *Invest New Drugs* 2006, **24**(6):543-546.
187. Heath EI, Hillman DW, Vaishampayan U, Sheng S, Sarkar F, Harper F, Gaskins M, Pitot HC, Tan W, Ivy SP *et al*: **A phase II trial of 17-allylamino-17-**

- demethoxygeldanamycin in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008, **14**(23):7940-7946.
188. Sausville EA, Tomaszewski JE, Ivy P: **Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin.** *Curr Cancer Drug Targets* 2003, **3**(5):377-383.
189. Cysyk RL, Parker RJ, Barchi JJ, Jr., Steeg PS, Hartman NR, Strong JM: **Reaction of geldanamycin and C17-substituted analogues with glutathione: product identifications and pharmacological implications.** *Chem Res Toxicol* 2006, **19**(3):376-381.
190. Ernster L: **DT-diaphorase.** *Methods Enzymol* 1967, **10**:309-317.
191. Li R, Bianchet MA, Talalay P, Amzel LM: **The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(19):8846-8850.
192. Foster CE, Bianchet MA, Talalay P, Faig M, Amzel LM: **Structures of mammalian cytosolic quinone reductases.** *Free Radic Biol Med* 2000, **29**(3-4):241-245.
193. Guo W, Reigan P, Siegel D, Zirrolli J, Gustafson D, Ross D: **Formation of 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG) hydroquinone by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role of 17-AAG hydroquinone in heat shock protein 90 inhibition.** *Cancer Res* 2005, **65**(21):10006-10015.
194. Sydor JR, Normant E, Pien CS, Porter JR, Ge J, Grenier L, Pak RH, Ali JA, Dembski MS, Hudak J *et al*: **Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(46):17408-17413.
195. Guo W, Reigan P, Siegel D, Zirrolli J, Gustafson D, Ross D: **The bioreduction of a series of benzoquinone ansamycins by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to more potent heat shock protein 90 inhibitors, the hydroquinone ansamycins.** *Mol Pharmacol* 2006, **70**(4):1194-1203.
196. Maroney AC, Marugan JJ, Mezzasalma TM, Barnakov AN, Garrabrant TA, Weaner LE, Jones WJ, Barnakova LA, Koblisch HK, Todd MJ *et al*: **Dihydroquinone ansamycins: toward resolving the conflict between low in vitro affinity and high cellular potency of geldanamycin derivatives.** *Biochemistry* 2006, **45**(17):5678-5685.
197. Guo W, Siegel D, Ross D: **Stability of the Hsp90 inhibitor 17AAG hydroquinone and prevention of metal-catalyzed oxidation.** *J Pharm Sci* 2008, **97**(12):5147-5157.
198. Douglas M, Lim AR, Porter JR, West K, Pink MM, Ge J, Wylie AA, Tibbits TT, Biggs K, Curtis M *et al*: **The antiproliferative activity of the heat shock protein 90 inhibitor IPI-504 is not dependent on NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(12):3369-3378.
199. Benchekroun MN, Schneider E, Safa AR, Townsend AJ, Sinha BK: **Mechanisms of resistance to ansamycin antibiotics in human breast cancer cell lines.** *Mol Pharmacol* 1994, **46**(4):677-684.

200. McCollum AK, TenEyck CJ, Stensgard B, Morlan BW, Ballman KV, Jenkins RB, Toft DO, Erlichman C: **P-Glycoprotein-mediated resistance to Hsp90-directed therapy is eclipsed by the heat shock response.** *Cancer Res* 2008, **68**(18):7419-7427.
201. Perez-Tomas R: **Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment.** *Curr Med Chem* 2006, **13**(16):1859-1876.
202. He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF: **Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1).** *Curr Med Chem* 2011, **18**(3):439-481.
203. Mo W, Zhang JT: **Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance.** *Int J Biochem Mol Biol* 2012, **3**(1):1-27.
204. Delmotte P, Delmotte-Plaquee J: **A new antifungal substance of fungal origin.** *Nature (Lond)* 1953:171:344.
205. Schulte TW, Akinaga S, Soga S, Sullivan W, Stensgard B, Toft D, Neckers LM: **Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin.** *Cell Stress Chaperones* 1998, **3**(2):100-108.
206. Yang ZQ, Geng X, Solit D, Pratilas CA, Rosen N, Danishefsky SJ: **New efficient synthesis of resorcinylic macrolides via ynolides: establishment of cycloproparadicicol as synthetically feasible preclinical anticancer agent based on Hsp90 as the target.** *J Am Chem Soc* 2004, **126**(25):7881-7889.
207. Soga S, Shiotsu Y, Akinaga S, Sharma SV: **Development of radicicol analogues.** *Curr Cancer Drug Targets* 2003, **3**(5):359-369.
208. Ishii T, Seike T, Nakashima T, Juliger S, Maharaj L, Soga S, Akinaga S, Cavenagh J, Joel S, Shiotsu Y: **Anti-tumor activity against multiple myeloma by combination of KW-2478, an Hsp90 inhibitor, with bortezomib.** *Blood Cancer J* 2012, **2**(4):e68.
209. Goldman JW, Raju RN, Gordon GA, El-Hariry I, Teofilivici F, Vukovic VM, Bradley R, Karol MD, Chen Y, Guo W *et al*: **A first in human, safety, pharmacokinetics, and clinical activity phase I study of once weekly administration of the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in patients with solid malignancies.** *BMC Cancer* 2013, **13**:152.
210. Socinski MA, Goldman J, El-Hariry I, Koczywas M, Vukovic V, Horn L, Paschold E, Salgia R, West H, Sequist LV *et al*: **A multicenter phase II study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(11):3068-3077.
211. Woodhead AJ, Angove H, Carr MG, Chessari G, Congreve M, Coyle JE, Cosme J, Graham B, Day PJ, Downham R *et al*: **Discovery of (2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-[5-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-1,3-dihydrois oindol-2-yl]methanone (AT13387), a novel inhibitor of the molecular chaperone Hsp90 by fragment based drug design.** *J Med Chem* 2010, **53**(16):5956-5969.
212. Graham B, Curry J, Smyth T, Fazal L, Feltell R, Harada I, Coyle J, Williams B, Reule M, Angove H *et al*: **The heat shock protein 90 inhibitor, AT13387, displays a long duration of action in vitro and in vivo in non-small cell lung cancer.** *Cancer Sci* 2012, **103**(3):522-527.

Bibliografia

213. Smyth T, Van Looy T, Curry JE, Rodriguez-Lopez AM, Wozniak A, Zhu M, Donsky R, Morgan JG, Mayeda M, Fletcher JA *et al*: **The HSP90 inhibitor, AT13387, is effective against imatinib-sensitive and -resistant gastrointestinal stromal tumor models.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(8):1799-1808.
214. Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, Munster PN, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, Rosen N: **A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells.** *Chem Biol* 2001, **8**(3):289-299.
215. Lundgren K, Zhang H, Brekken J, Huser N, Powell RE, Timple N, Busch DJ, Neely L, Sensintaffar JL, Yang YC *et al*: **BIIB021, an orally available, fully synthetic small-molecule inhibitor of the heat shock protein Hsp90.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(4):921-929.
216. Dickson MA, Okuno SH, Keohan ML, Maki RG, D'Adamo DR, Akhurst TJ, Antonescu CR, Schwartz GK: **Phase II study of the HSP90-inhibitor BIIB021 in gastrointestinal stromal tumors.** *Ann Oncol* 2013, **24**(1):252-257.
217. Saif MW, Takimoto C, Mita M, Banerji U, Lamanna N, Castro J, O'Brien S, Stogard C, Von Hoff D: **A phase 1, dose-escalation, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of BIIB021 administered orally in patients with advanced solid tumors.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**(2):445-455.
218. Breinig M, Caldas-Lopes E, Goeppert B, Malz M, Rieker R, Bergmann F, Schirmacher P, Mayer M, Chiosis G, Kern MA: **Targeting heat shock protein 90 with non-quinone inhibitors: a novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2009, **50**(1):102-112.
219. Gallerne C, Prola A, Lemaire C: **Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1833**(6):1356-1366.
220. Bao R, Lai CJ, Wang DG, Qu H, Yin L, Zifcak B, Tao X, Wang J, Atoyan R, Samson M *et al*: **Targeting heat shock protein 90 with CUDC-305 overcomes erlotinib resistance in non-small cell lung cancer.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**(12):3296-3306.
221. Menezes DL, Taverna P, Jensen MR, Abrams T, Stuart D, Yu GK, Duhl D, Machajewski T, Sellers WR, Pryer NK *et al*: **The novel oral Hsp90 inhibitor NVP-HSP990 exhibits potent and broad-spectrum antitumor activities in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**(3):730-739.
222. Okawa Y, Hideshima T, Steed P, Vallet S, Hall S, Huang K, Rice J, Barabasz A, Foley B, Ikeda H *et al*: **SNX-2112, a selective Hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematologic tumors by abrogating signaling via Akt and ERK.** *Blood* 2009, **113**(4):846-855.
223. Liu KS, Ding WC, Wang SX, Liu Z, Xing GW, Wang Y, Wang YF: **The heat shock protein 90 inhibitor SNX-2112 inhibits B16 melanoma cell growth in vitro and in vivo.** *Oncol Rep* 2012, **27**(6):1904-1910.

224. Rajan A, Kelly RJ, Trepel JB, Kim YS, Alarcon SV, Kummar S, Gutierrez M, Crandon S, Zein WM, Jain L *et al*: **A phase I study of PF-04929113 (SNX-5422), an orally bioavailable heat shock protein 90 inhibitor, in patients with refractory solid tumor malignancies and lymphomas.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(21):6831-6839.
225. Brough PA, Aherne W, Barril X, Borgognoni J, Boxall K, Cansfield JE, Cheung KM, Collins I, Davies NG, Drysdale MJ *et al*: **4,5-diarylisoaxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer.** *J Med Chem* 2008, **51**(2):196-218.
226. Jensen MR, Schoepfer J, Radimerski T, Massey A, Guy CT, Brueggen J, Quadt C, Buckler A, Cozens R, Drysdale MJ *et al*: **NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**(2):R33.
227. Stuhmer T, Zollinger A, Siegmund D, Chatterjee M, Grella E, Knop S, Kortum M, Unzicker C, Jensen MR, Quadt C *et al*: **Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma.** *Leukemia* 2008, **22**(8):1604-1612.
228. Gaspar N, Sharp SY, Eccles SA, Gowan S, Popov S, Jones C, Pearson A, Vassal G, Workman P: **Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**(5):1219-1233.
229. Centenera MM, Gillis JL, Hanson AR, Jindal S, Taylor RA, Risbridger GP, Sutherland PD, Scher HI, Raj GV, Knudsen KE *et al*: **Evidence for efficacy of new Hsp90 inhibitors revealed by ex vivo culture of human prostate tumors.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(13):3562-3570.
230. Garon EB, Finn RS, Hamidi H, Dering J, Pitts S, Kamranpour N, Desai AJ, Hosmer W, Ide S, Avsar E *et al*: **The HSP90 inhibitor NVP-AUY922 potently inhibits non-small cell lung cancer growth.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**(6):890-900.
231. Sessa C, Shapiro GI, Bhalla KN, Britten C, Jacks KS, Mita M, Papadimitrakopoulou V, Pluard T, Samuel TA, Akimov M *et al*: **First-in-human phase I dose-escalation study of the HSP90 inhibitor AUY922 in patients with advanced solid tumors.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(13):3671-3680.
232. Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, Mendelson D, Solit DB, Bagatell R, Ma W, Wheeler J, Rosen N, Norton L *et al*: **Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(34):5410-5417.
233. Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N, D'Andrea G, Dickler M, Moynahan ME, Sugarman S *et al*: **HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(15):5132-5139.
234. Richardson PG, Chanan-Khan AA, Lonial S, Krishnan AY, Carroll MP, Alsina M, Albitar M, Berman D, Messina M, Anderson KC: **Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory**

- multiple myeloma: results of a phase 1/2 study. *Br J Haematol* 2011, **153**(6):729-740.
235. Vaishampayan UN, Burger AM, Sausville EA, Heilbrun LK, Li J, Horiba MN, Egorin MJ, Ivy P, Pacey S, Lorusso PM: **Safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the combination of sorafenib and tanespimycin.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**(14):3795-3804.
236. Tse AN, Klimstra DS, Gonen M, Shah M, Sheikh T, Sikorski R, Carvajal R, Mui J, Tipian C, O'Reilly E *et al*: **A phase 1 dose-escalation study of irinotecan in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with solid tumors.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(20):6704-6711.
237. Sain N, Krishnan B, Ormerod MG, De Rienzo A, Liu WM, Kaye SB, Workman P, Jackman AL: **Potential of paclitaxel activity by the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated AKT.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(5):1197-1208.
238. Nguyen DM, Lorang D, Chen GA, Stewart JH, Tabibi E, Schrupp DS: **Enhancement of paclitaxel-mediated cytotoxicity in lung cancer cells by 17-allylamino geldanamycin: in vitro and in vivo analysis.** *Ann Thorac Surg* 2001, **72**(2):371-378; discussion 378-379.
239. Ramalingam SS, Egorin MJ, Ramanathan RK, Remick SC, Sikorski RP, Lagattuta TF, Chatta GS, Friedland DM, Stoller RG, Potter DM *et al*: **A phase I study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin combined with paclitaxel in patients with advanced solid malignancies.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(11):3456-3461.
240. Katragadda U, Fan W, Wang Y, Teng Q, Tan C: **Combined delivery of paclitaxel and tanespimycin via micellar nanocarriers: pharmacokinetics, efficacy and metabolomic analysis.** *PLoS One* 2013, **8**(3):e58619.
241. Iyer G, Morris MJ, Rathkopf D, Slovin SF, Steers M, Larson SM, Schwartz LH, Curley T, DeLaCruz A, Ye Q *et al*: **A phase I trial of docetaxel and pulse-dose 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2012, **69**(4):1089-1097.
242. Hendrickson AE, Oberg AL, Glaser G, Camoriano JK, Peethambaram PP, Colon-Otero G, Erlichman C, Ivy SP, Kaufmann SH, Karnitz LM *et al*: **A phase II study of gemcitabine in combination with tanespimycin in advanced epithelial ovarian and primary peritoneal carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2012, **124**(2):210-215.
243. Hubbard J, Erlichman C, Toft DO, Qin R, Stensgard BA, Felten S, Ten Eyck C, Batzel G, Ivy SP, Haluska P: **Phase I study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, gemcitabine and/or cisplatin in patients with refractory solid tumors.** *Invest New Drugs* 2011, **29**(3):473-480.
244. Wainberg ZA, Anghel A, Rogers AM, Desai AJ, Kalous O, Conklin D, Ayala R, O'Brien NA, Quadri C, Akimov M *et al*: **Inhibition of HSP90 with AUY922 induces synergy in HER2-amplified trastuzumab-resistant breast and gastric cancer.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**(4):509-519.
245. Bliss C: **The toxicity of poisons applied jointly.** *Ann Appl Biol* 1939, **26**:585-615.

246. Puck TT, Marcus PI: **Action of x-rays on mammalian cells.** *J Exp Med* 1956, **103**(5):653-666.
247. Wu RS, Panusz HT, Hatch CL, Bonner WM: **Histones and their modifications.** *CRC Crit Rev Biochem* 1986, **20**(2):201-263.
248. Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M, Oguro M, Nagano H, Mano Y: **Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha.** *Nature* 1978, **275**(5679):458-460.
249. Pedrali-Noy G, Spadari S, Miller-Faures A, Miller AO, Kruppa J, Koch G: **Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin.** *Nucleic Acids Res* 1980, **8**(2):377-387.
250. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *J Immunol* 1992, **148**(7):2207-2216.
251. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: **A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.** *J Immunol Methods* 1995, **184**(1):39-51.
252. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
253. Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P: **Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(9):5216-5220.
254. Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, Gaut AW, Liu J, Zhang YP, Weydert CJ, Domann FE, Oberley LW: **Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism.** *Cancer Res* 2003, **63**(17):5513-5520.
255. Winski SL, Faig M, Bianchet MA, Siegel D, Swann E, Fung K, Duncan MW, Moody CJ, Amzel LM, Ross D: **Characterization of a mechanism-based inhibitor of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 by biochemical, X-ray crystallographic, and mass spectrometric approaches.** *Biochemistry* 2001, **40**(50):15135-15142.
256. Dehn DL, Siegel D, Swann E, Moody CJ, Ross D: **Biochemical, cytotoxic, and genotoxic effects of ES936, a mechanism-based inhibitor of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, in cellular systems.** *Mol Pharmacol* 2003, **64**(3):714-720.
257. López T, Silva D, López S, Arias C: **RNA de interferencia: el silencio de los genes.** *Biotecnología* 2007, **V14**:109-118.
258. Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP: **Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation.** *Curr Biol* 2008, **18**(17):1269-1277.
259. Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP: **The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade.** *Front Biosci* 2008, **13**:4258-4275.

Bibliografia

260. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD: **Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation.** *Chromosoma* 1997, **106**(6):348-360.
261. Perez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR: **H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase.** *Biochem Cell Biol* 2009, **87**(5):695-709.
262. Nigg EA: **Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**(1):21-32.
263. Berry LD, Gould KL: **Regulation of Cdc2 activity by phosphorylation at T14/Y15.** *Prog Cell Cycle Res* 1996, **2**:99-105.
264. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW: **Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.** *Nature* 1991, **349**(6305):132-138.
265. Ross D, Siegel D: **NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics.** *Methods Enzymol* 2004, **382**:115-144.
266. Siegel D, Shieh B, Yan C, Kepa JK, Ross D: **Role for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and manganese-dependent superoxide dismutase in 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin-induced heat shock protein 90 inhibition in pancreatic cancer cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2011, **336**(3):874-880.
267. Davies BR, Logie A, McKay JS, Martin P, Steele S, Jenkins R, Cockerill M, Cartledge S, Smith PD: **AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(8):2209-2219.
268. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chene P, De Pover A, Schoemaker K *et al*: **Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(7):1851-1863.
269. Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Beger HG, Adler G: **Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma.** *Cancer Res* 1994, **54**(2):547-551.
270. Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM, Jr., Evers BM: **Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers.** *Surg Oncol* 1995, **4**(4):197-203.
271. Moser C, Lang SA, Hackl C, Wagner C, Scheiffert E, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O: **Targeting HSP90 by the novel inhibitor NVP-AUY922 reduces growth and angiogenesis of pancreatic cancer.** *Anticancer Res* 2012, **32**(7):2551-2561.
272. Lee KH, Lee JH, Han SW, Im SA, Kim TY, Oh DY, Bang YJ: **Antitumor activity of NVP-AUY922, a novel heat shock protein 90 inhibitor, in human gastric cancer**

- cells is mediated through proteasomal degradation of client proteins. *Cancer Sci* 2011, **102**(7):1388-1395.
273. Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y: **The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention.** *Cell Cycle* 2004, **3**(1):51-60.
274. Sauvageot CM, Weatherbee JL, Kesari S, Winters SE, Barnes J, Dellagatta J, Ramakrishna NR, Stiles CD, Kung AL, Kieran MW *et al*: **Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells.** *Neuro Oncol* 2009, **11**(2):109-121.
275. Zitzmann K, Ailer G, Vlotides G, Spoettl G, Maurer J, Goke B, Beuschlein F, Auernhammer CJ: **Potent antitumor activity of the novel HSP90 inhibitors AUY922 and HSP990 in neuroendocrine carcinoid cells.** *Int J Oncol* 2013, **43**(6):1824-1832.
276. Lang SA, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp FC, Dahlke MH, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK *et al*: **Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1alpha autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(21):6459-6468.
277. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA: **Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis.** *Cancer Res* 2001, **61**(10):4003-4009.
278. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC: **AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis.** *Carcinogenesis* 2002, **23**(1):201-205.
279. Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ: **Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer.** *Br J Cancer* 2003, **89**(11):2110-2115.
280. Khalailah A, Dreazen A, Khatib A, Apel R, Swisa A, Kidess-Bassir N, Maitra A, Meyuhas O, Dor Y, Zamir G: **Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer.** *Cancer Res* 2013, **73**(6):1811-1820.
281. Kiang JG, Tsokos GC: **Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.** *Pharmacol Ther* 1998, **80**(2):183-201.
282. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R: **Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1.** *Cell* 1998, **94**(4):471-480.
283. Bagatell R, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, Pulcini EJ, Akinaga S, Benjamin IJ, Whitesell L: **Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(8):3312-3318.
284. Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S, Kumaraswamy S, Balasis M, Greedy B, Armitage ES *et al*: **Abrogation of heat shock protein 70**

- induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res* 2005, **65**(22):10536-10544.
285. Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Voutsinas GE: **17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells.** *BMC Cancer* 2010, **10**:481.
286. Senju M, Sueoka N, Sato A, Iwanaga K, Sakao Y, Tomimitsu S, Tominaga M, Irie K, Hayashi S, Sueoka E: **Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2006, **132**(3):150-158.
287. Srethapakdi M, Liu F, Tavorath R, Rosen N: **Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest.** *Cancer Res* 2000, **60**(14):3940-3946.
288. Garcia-Morales P, Carrasco-Garcia E, Ruiz-Rico P, Martinez-Mira R, Menendez-Gutierrez MP, Ferragut JA, Saceda M, Martinez-Lacaci I: **Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines.** *Oncogene* 2007, **26**(51):7185-7193.
289. Zajac M, Moneo MV, Carnero A, Benitez J, Martinez-Delgado B: **Mitotic catastrophe cell death induced by heat shock protein 90 inhibitor in BRCA1-deficient breast cancer cell lines.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(8):2358-2366.
290. Milanovic D, Firat E, Grosu AL, Niedermann G: **Increased radiosensitivity and radiothermosensitivity of human pancreatic MIA PaCa-2 and U251 glioblastoma cell lines treated with the novel Hsp90 inhibitor NVP-HSP990.** *Radiat Oncol* 2013, **8**:42.
291. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S *et al*: **Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.** *Cell Death Differ* 2012, **19**(1):107-120.
292. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G: **Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(6):385-392.
293. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G: **Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties.** *Cell Cycle* 2006, **5**(22):2592-2601.
294. Zhao ZG, Shen WL: **Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901.** *World J Gastroenterol* 2005, **11**(1):73-78.
295. Powers MV, Clarke PA, Workman P: **Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis.** *Cancer Cell* 2008, **14**(3):250-262.
296. McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, Toft DO, Erlichman C: **Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin**

- through a glutathione-mediated mechanism. *Cancer Res* 2006, **66**(22):10967-10975.
297. Zhang H, Neely L, Lundgren K, Yang YC, Lough R, Timple N, Burrows F: **BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance.** *Int J Cancer* 2010, **126**(5):1226-1234.
298. Liu H, Zhang T, Chen R, McConkey DJ, Ward JF, Curley SA: **Multiple kinase pathways involved in the different de novo sensitivity of pancreatic cancer cell lines to 17-AAG.** *J Surg Res* 2012, **176**(1):147-153.
299. Kelland LR, Sharp SY, Rogers PM, Myers TG, Workman P: **DT-Diaphorase expression and tumor cell sensitivity to 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90.** *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(22):1940-1949.
300. Schlager JJ, Powis G: **Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor)oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol.** *Int J Cancer* 1990, **45**(3):403-409.
301. Marin A, Lopez de Cerain A, Hamilton E, Lewis AD, Martinez-Penuela JM, Idoate MA, Bello J: **DT-diaphorase and cytochrome B5 reductase in human lung and breast tumours.** *Br J Cancer* 1997, **76**(7):923-929.
302. Siegel D, Ross D: **Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues.** *Free Radic Biol Med* 2000, **29**(3-4):246-253.
303. Lewis AM, Ough M, Hinkhouse MM, Tsao MS, Oberley LW, Cullen JJ: **Targeting NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer.** *Mol Carcinog* 2005, **43**(4):215-224.
304. Hadley KE, Hendricks DT: **Use of NQO1 status as a selective biomarker for oesophageal squamous cell carcinomas with greater sensitivity to 17-AAG.** *BMC Cancer* 2014, **14**:334.
305. Brunton VG, Steele G, Lewis AD, Workman P: **Geldanamycin-induced cytotoxicity in human colon-cancer cell lines: evidence against the involvement of c-Src or DT-diaphorase.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1998, **41**(5):417-422.
306. Siegel D, Yan C, Ross D: **NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones.** *Biochem Pharmacol* 2012, **83**(8):1033-1040.
307. Gaspar N, Sharp SY, Pacey S, Jones C, Walton M, Vassal G, Eccles S, Pearson A, Workman P: **Acquired resistance to 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in glioblastoma cells.** *Cancer Res* 2009, **69**(5):1966-1975.
308. Millson SH, Prodromou C, Piper PW: **A simple yeast-based system for analyzing inhibitor resistance in the human cancer drug targets Hsp90alpha/beta.** *Biochem Pharmacol* 2010, **79**(11):1581-1588.
309. Kang BH, Plescia J, Song HY, Meli M, Colombo G, Beebe K, Scroggins B, Neckers L, Altieri DC: **Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90.** *J Clin Invest* 2009, **119**(3):454-464.

Bibliografía

310. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P *et al*: **Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.** *J Clin Oncol* 1997, **15**(6):2403-2413.
311. Heinemann V, Boeck S, Hinke A, Labianca R, Louvet C: **Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer.** *BMC Cancer* 2008, **8**:82.
312. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ: **Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(7):1209-1214.
313. Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ: **Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines.** *Biochem Pharmacol* 2007, **73**(11):1715-1726.
314. Moser C, Lang SA, Kainz S, Gaumann A, Fichtner-Feigl S, Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O: **Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(11):2868-2878.
315. Chen MH, Chiang KC, Cheng CT, Huang SC, Chen YY, Chen TW, Yeh TS, Jan YY, Wang HM, Weng JJ *et al*: **Antitumor activity of the combination of an HSP90 inhibitor and a PI3K/mTOR dual inhibitor against cholangiocarcinoma.** *Oncotarget* 2014, **5**(9):2372-2389.
316. Walker T, Mitchell C, Park MA, Yacoub A, Rahmani M, Haussinger D, Reinehr R, Voelkel-Johnson C, Fisher PB, Grant S *et al*: **17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin and MEK1/2 inhibitors kill GI tumor cells via Ca²⁺-dependent suppression of GRP78/BiP and induction of ceramide and reactive oxygen species.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**(5):1378-1395.
317. Grasso S, Tristante E, Saceda M, Carbonell P, Mayor-Lopez L, Carballo-Santana M, Carrasco-Garcia E, Rocamora-Reverte L, Garcia-Morales P, Carballo F *et al*: **Resistance to Selumetinib (AZD6244) in Colorectal Cancer Cell Lines is Mediated by p70S6K and RPS6 Activation.** *Neoplasia* 2014, **16**(10):845-860.

