



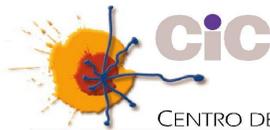
**Estudio del valor patogénico
de la expresión y ruta
de señalización de KIT e IGF1R
en Sarcoma de Ewing:
¿nuevas posibles dianas
terapéuticas?**

Ana Sofia da Silva Martins

Salamanca 2008



Programa Operacional Ciência e Inovação 2010
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Universidad de Salamanca-CSIC



Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca, España
Tel. +34 923 29 47 20
Fax +34 923 29 47 43
www.cicancer.org

Tesis Doctoral

**Estudio del valor patogénico de
la expresión y ruta
de señalización de KIT e IGF1R
en Sarcoma de Ewing:
¿nuevas posibles dianas
terapéuticas?**

Ana Sofia da Silva Martins

Salamanca 2008



D. ENRIQUE DE ÁLAVA CASADO, Doctor en Medicina y Cirugía e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo mi dirección por la licenciada en Bioquímica **ANA SOFIA DA SILVA MARTINS** titulado “**Estudio del valor patogénico de la expresión y ruta de señalización de KIT e IGF1R en Sarcoma de Ewing: ¿nuevas posibles dianas terapéuticas?**”, reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y contenido requeridas para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 22 de abril de 2008.

Fdo. Dr. Enrique de Álava Casado

VºBº: Dr. Avelino Bueno
Profesor del Departamento de Microbiología y Genética
Tutor del presente trabajo de Doctorado

Este proyecto de tesis ha sido financiado por:

Fundação Para a Ciência e Tecnologia, Programa POCl (Programa Operacional Ciência e Inovação), del III Quadro Comunitário de Apoio, del Fondo Social Europeo y del Ministerio de la Ciência e Tecnología Portugués.

Fondo de Investigación Sanitaria, con los proyectos “*Valor patogenético de la expresión de c-kit en el Tumor de Ewing. Una posible diana terapéutica*” (PI020828) y “*Patología Molecular de los sarcomas, con énfasis en el Tumor de Ewing: diseño y validación de nuevas herramientas diagnósticas y de individualización terapéutica*” (PI052524).

Fundación Ramón Areces, con el proyecto “*Sarcomas: estudios transcriptómicos y proteómicos encaminados a mejorar la detección precoz, el diagnóstico molecular y la terapia individualizada*”.

La Red de Excelencia de la Comunidad Europea EUROBONET, con el Proyecto Europeo “*Molecular Pathology of Bone Tumors*” (FP6-2004-Lifescihealth-5, 018814).

Agradecimientos

Al Dr. Enrique de Álava, por haberme iniciado en el mundo de la ciencia. Por haber sido no tan solo un tutor sino también alguien con quien se podía hablar abiertamente. Muchas gracias por todos tus consejos y por el apoyo que siempre me diste. Gracias por la confianza que has puesto en mí.

A todos mis compañeros de laboratorio:

A José, por su “tutoría” y más que eso, su completa dedicación en el tema de los modelos animales y por sus comentarios y sugerencias;

A Juan, por sus comentarios y sugerencias, siempre muy útiles en todo mi trabajo;

A Dani, por su ayuda con el tema de las “transfecciones” y sus comentarios y sugerencias;

A Carlos y David por los numerosos momentos de risa que tuvimos, por su alegría contagiante y claro, por toda su ayuda a lo largo de estos años;

A Gemma y Vicky, por su frescura y alegría, su ayuda con la corrección de mi “portuñol” y su apoyo en todo momento (Danke Gemma ;0) Gracias Vicky) ¡Sois estupendas!

A Anita, por ser tan buena compañera y por aguantarme mis manías de la limpieza ;0);

A todos los que han pasado por el laboratorio y que han sido importantes, en especial a Nilka, Alfredo, Pacheco, Maria y Virginia.

Gracias por todos los momentos estupendos que tuvimos.

Nunca me olvidaré de la famosa cena del “Bacalhau com Natas” ni de los numerosos cafés en que me dolía la tripa de tanto reír. Habéis estado allí para mí cuando lo más he necesitado y eso... no se olida nunca...

A los chicos del L15, por haber sido el “mejor laboratorio de enfrente” que he conocido ;0) . Siempre nos habéis ayudado y al principio erais nuestra

salvación. Em especial à Joana, pelos momentos do cafezinho em que nos apoiávamos uma à outra e desabafávamos. Terás sempre um lugarzinho muito especial no meu coração.

A las chicas del Banco de Tumores, en especial a Tere, por las inmunos que me han echo, siempre intentando mejorar los resultados obtenidos. Gracias por vuestro empeño.

Às meninas de Coimbra, obrigada por nunca se esquecerem de mim, por manterem viva esta nossa amizade. E vivam os jantares das meninas!!
À Rita... que posso dizer? És e serás sempre a minha melhor amiga.
Obrigada pelo teu apoio, por me ouvires, por estares aí para eu desabafar.

À Zefinha e ao Beep. Obrigada por serem tão compreensivos comigo. Mesmo indo aos escuteiros só de vez em quando voçês recebem-me sempre de braços abertos. Obrigada por serem “os meus amigos de Oliveira”. Nunca me esquecerei daquele Domingo de Páscoa depois da missa em que chorámos juntos... Isso é que é amizade. Partilhar não só as alegrias mas também as tristezas... Obrigada do fundo do coração...
Aos meus meninos dos escuteiros. Obrigado por me fazerem sentir orgulhosa de voçês e por me fazerem sentir realizada cada vez que vou a casa ;0).

A toda a minha familia, em especial os meus avós. Obrigado pelo vosso carinho.

Ao André, obrigado por tudo! Ainda que nem tudo tenha corrido como sonhávamos, nunca deixaremos de ser amigos e nunca deixarei de ter um carinho especial por ti.

“Obrigado por saberes cuidar de mim, tratar de mim, olhar por mim, escutar quem sou, e se ao menos tudo fosse igual a ti...”

Aos meus pais, que me deram a sua vida e que sempre estiveram lá para mim. Hoje sou quem sou por vocês. E sinto-me orgulhosa de o ser.
A vós, que compartilhastes comigo tanto as minhas alegrias como a minha mais profunda dor, obrigado pelo vosso apoio e compreensão.

Ao meu pequeno irmão Ricardo (para mim serás sempre pequeno ;o)) obrigado pelo teu amor e carinho. Soubeste apoiar-me nos momentos difíceis e “levar-me” de borganha naqueles mais fáceis. Nunca deixaremos de ser os ursinhos carinhosos!!

To Kuba, for giving me the opportunity to “lern Polish”, ja ja ja ;0).

Thank you for showing me how amazing life can be.

Jestem bardzo szczęśliwe z tobę.

“I just want you close, were you can stay forever! You can be sure,
That it’ll only get better. You and me together, through the days and nights,
I don’t worry ‘cause everything is going to be all right”.

Y a todos los demás que puede haber olvidado,
gracias, obrigada, thank you!

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Sarcoma de Ewing | 3 |
| 1.1.1 Diagnóstico | 6 |
| 1.1.2 Pronóstico | 9 |
| 1.1.3 Terapia | 10 |
| 1.1.4 Genes de fusión | 12 |
| 1.1.4.1 EWS-FLI1 | 12 |
| 1.1.4.2 Otros tipos de fusión | 16 |
| 1.1.4.3 Otras alteraciones | 16 |
| 1.1.5 Rutas autocrinas | 17 |
| 1.1.5.1 Ruta de señalización del IGF1R | 17 |
| 1.1.5.2 Ruta de señalización de c-kit | 23 |
| 1.2 Respuesta al Stress | 27 |
| 1.2.1 HSPs | 27 |
| 1.2.2 HSP90 | 28 |
| 1.2.2.1 Estructura y función de HSP90 | 29 |
| 1.2.2.2 Proteínas cliente de HSP90 | 31 |
| 1.2.2.3 HSP90 y cáncer | 32 |
| 1.3 Terapia Dirigida | 33 |
| 1.3.1 Inhibidores de los RTKs | 34 |
| 1.3.1.1 Inhibidores de c-kit | 35 |
| 1.3.1.2 Inhibidores de IGF1R | 36 |
| 1.3.2 Inhibidores de HSP90 | 37 |
| 1.3.3 Tratamientos combinados | 38 |
| | |
| 2. Hipótesis y Objetivos | 41 |
| | |
| 3. Materiales y Métodos | 45 |
| 3.1 Materiales | 47 |
| 3.1.1 Líneas Celulares | 47 |
| 3.1.1.1 Características de las líneas | 47 |
| 3.1.1.2 Condiciones de cultivo | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1.3 Crecimiento y mantenimiento | 49 |
| 3.1.1.4 Congelación y descongelación..... | 50 |
| 3.1.2 Modelo animal..... | 51 |
| 3.1.3 Muestras Clínicas..... | 52 |
| 3.1.4 Fármacos | 52 |
| 3.1.4.1 Inhibidores específicos de IGF1R, c-kit y HSP90 y Quimioterápicos tradicionales | 53 |
| 3.1.4.2 Tratamiento con fármacos..... | 55 |
| 3.2 Métodos | 56 |
| 3.2.1 Medición del crecimiento celular por incorporación de MTT | 56 |
| 3.2.1.1 Medición | 56 |
| 3.2.1.2 Análisis Isoblográfico..... | 57 |
| 3.2.2 Western Blotting..... | 58 |
| 3.2.2.1 Extracción de proteína..... | 58 |
| 3.2.2.2 Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras proteicas..... | 59 |
| 3.2.2.3 Electroforesis | 60 |
| 3.2.2.4 Transferencia..... | 62 |
| 3.2.2.5 Inmunodetección | 63 |
| 3.2.2.6 Densitometría | 64 |
| 3.2.2.7 Stripping..... | 65 |
| 3.2.3. Inmunoprecipitación | 65 |
| 3.2.4 RT-PCR..... | 66 |
| 3.2.4.1 RT | 67 |
| 3.2.4.2 PCR | 70 |
| 3.2.5 Secuenciación..... | 71 |
| 3.2.5.1 Preparación de la reacción de PCR | 72 |
| 3.2.5.2 Precipitación de la reacción de secuenciación. | 72 |
| 3.2.5.3 Preparación del secuenciador | 73 |
| 3.2.5.4 Secuenciación y análisis | 73 |
| 3.2.6 Real Time PCR | 74 |
| 3.2.7 Estudios de muerte celular por apoptosis..... | 76 |
| 3.2.8 Estudios de ciclo celular..... | 77 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.9 Estudios de movilidad celular | 78 |
| 3.2.10 Estudios de crecimiento celular en agar blando-independiente de anclaje | 79 |
| 3.2.11 Estudios de ELISA | 79 |
| 3.2.12 Estudios de proteómica | 80 |
| 3.2.12.1 Extracción de proteína y cuantificación..... | 81 |
| 3.2.12.2 Electroforesis de primera dimensión | 83 |
| 3.2.12.3 Electroforesis de segunda dimensión | 83 |
| 3.2.12.4 Espectroscopia de masas por MALDI-ToF | 86 |
| 3.2.13 Inducción de expresión | 89 |
| 3.2.13.1 Obtención del clon de HSP90 en un vector de expresión | 89 |
| 3.2.13.2 Transfección | 92 |
| 3.2.14. Interferencia de ARN | 93 |
| 3.2.15 Inmunocitoquímica | 94 |
| 3.2.15.1 Preparación de las muestras..... | 94 |
| 3.2.15.2 Inmunodetección | 96 |
| 3.2.16 Estudios del crecimiento tumoral in vivo..... | 100 |
| 3.2.17 Tratamiento estadístico..... | 101 |
| 4. Resultados | 103 |
| 4.1 Estudio de la implicación de IGF1R y su ruta de señalización en Sarcoma de Ewing | 105 |
| 4.1.1 Expresión de IGF1R | 105 |
| 4.1.2 Efectos de ADW742 en la ruta de señalización de IGF1R | 106 |
| 4.1.3 Efectos de ADW742 en la proliferación, apoptosis y ciclo celular de las líneas de SE | 108 |
| 4.1.3.1 Efectos de ADW742 en la proliferación de las líneas celulares de SE | 108 |
| 4.1.3.2. Efectos de ADW742 en la apoptosis y ciclo celular | 109 |
| 4.2 Estudio de los efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit..... | 113 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1 Efectos de la combinación de ADW+IMA en la ruta de señalización de IGF1R | 113 |
| 4.2.2 Efectos de la combinación de ADW+IMA en la proliferación de las líneas celulares de SE | 116 |
| 4.2.3 Efectos de la combinación de ADW+IMA en la apoptosis y ciclo celular de las líneas de SE | 118 |
| 4.2.4 Efectos de la combinación de ADW+IMA en los niveles de VEGF | 120 |
| 4.3 Estudio de los efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la terapia convencional de SE..... | 121 |
| 4.3.1 Efectos de la combinación de ADW+DXR ó VCR en la ruta de señalización de IGF1R..... | 122 |
| 4.3.2 Efectos de la combinación de ADW+DXR ó VCR en la proliferación de las líneas celulares de SE | 124 |
| 4.3.3 Efectos de la combinación de ADW+DXR ó VCR en la apoptosis y ciclo celular de las líneas celulares de SE | 126 |
| 4.3.4 Efectos de la combinación de ADW+DXR, VCR ó IMA en la movilidad y crecimiento en agar blando | 134 |
| 4.4. Identificación del patrón de expresión proteica de líneas de Sarcoma de Ewing tratadas con ADW742 y/ó Imatinib y su relación con la resistencia de dichas células tumorales al tratamiento con distintos fármacos | 137 |
| 4.5 Identificación de nuevas posibles dianas terapéuticas a partir de los estudios de Proteómica, y comprobación con estudios moleculares..... | 142 |
| 4.6 Estudio de la implicación de HSP90 en Sarcoma de Ewing | 146 |
| 4.6.1 Expresión de HSP90 en líneas celulares de Sarcoma de Ewing | 146 |
| 4.6.2 Efectos de la inhibición de HSP90 con 17-AAG | 147 |
| 4.6.2.1 Efectos en la proliferación | 147 |
| 4.6.2.2 Efectos en la apoptosis | 148 |
| 4.6.2.3 Efectos en la expresión de las proteínas | |

| | |
|--|------------|
| cliente de HSP90..... | 149 |
| 4.7 Estudio de los efectos de la combinación de la inhibición de HSP90 con la de IGF1R ó c-kit en SE | 152 |
| 4.7.1 Modelos in Vitro | 152 |
| 4.7.1.1 Efectos en la proliferación | 152 |
| 4.7.1.2 Efectos en la apoptosis | 152 |
| 4.7.1.3 Estudios adicionales con el HSP90-siARN y la sobre-expresión de HSP90 | 156 |
| 4.7.1.3.1 Estudios con el HSP90-siARN | 156 |
| 4.7.1.3.2 Estudios con la sobre-expresión de HSP90..... | 159 |
| 4.7.2. Modelos animales..... | 162 |
| 4.8 Comprobación de los resultados obtenidos en muestras clínicas de pacientes de SE..... | 165 |
| 5. Discusión..... | 169 |
| 5.1 Implicación de IGF1R y su ruta de señalización en el Sarcoma de Ewing | 172 |
| 5.1.1 Expresión de IGF1R y su ruta de señalización en el SE..... | 172 |
| 5.1.2 Efectos de la inhibición de IGF1R con ADW742 en la ruta de señalización de IGF1R..... | 172 |
| 5.1.3 Efectos de la inhibición de IGF1R en la proliferación, apoptosis y ciclo celular de las líneas de SE | 175 |
| 5.2 Efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit ó la terapia convencional del SE..... | 176 |
| 5.2.1 Efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit en el SE..... | 176 |
| 5.2.2 Efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la terapia convencional del SE | 178 |
| 5.3 Identificación del patrón de expresión proteica en líneas de SE tratadas con ADW742 y/ó Imatinib | 180 |
| 5.4 Implicación de HSP90 en Sarcoma de Ewing..... | 183 |

| | |
|--|------------|
| 5.4.1 Expresión de HSP90 en líneas de SE | 183 |
| 5.4.2 Inhibición de HSP90 en líneas de SE | 184 |
| 5.5 Efectos de la combinación de la inhibición HSP90 con la de IGF1R ó c-kit en el SE. | 187 |
| 5.6 Comprobación de los resultados obtenidos en muestras clínicas de pacientes de SE..... | 190 |
| 5.6.1 Comprobación de los estudios de la inhibición de IGF1R..... | 190 |
| 5.6.2 Comprobación de los estudios de la implicación de HSP90 en el SE | 192 |
| 6. Conclusiones | 193 |
| 7. Abreviaturas | 199 |
| 8. Bibliografía..... | 201 |
| 9. Anexos: Publicaciones | 247 |

La felicidad es todo el recorrido, no el destino!!!!

Autor desconocido

Para mis padres

Para mi hermanito Ricardo

Para Kuba

1. Introducción

1.1. Sarcoma de Ewing

Los sarcomas son tumores relativamente raros y diversos, derivados de tejidos conectivos, como el hueso, el músculo o el cartílago (1, 2). Se pueden dividir en dos categorías generales, basándose en su cariotipo: los sarcomas de cariotipo relativamente sencillo (con translocaciones cromosómicas recíprocas) y los sarcomas de cariotipo complejo (con alto grado de inestabilidad cromosómica y sin translocaciones específicas), teniendo diferentes estadios y tratamientos. En el primer grupo se incluyen el sarcoma de Ewing, el rhabdomioma alveolar y el sarcoma sinovial, entre otros y en el segundo grupo se incluyen el histiocitoma fibroso maligno, el leiomioma o el osteosarcoma, entre otros (2).

Los sarcomas representan menos del 10% de todos los tipos de cáncer (3-5), pero, sin embargo, son de los tumores de niños y de adultos jóvenes más agresivos, con una alta tasa de enfermedad metastásica y son refractarios a la terapia convencional (1, 6).

En el caso de los sarcomas se consideran 3 principales características con valor pronóstico, que son el grado, el tamaño y la localización del tumor (2).

Puesto que los sarcomas son poco comunes y comprenden un amplio abanico con diferentes tipos de tumores, es importante que se haga una evaluación lo más detallada posible de cada caso, a ser posible por un equipo multidisciplinar de expertos en el campo, que incluya oncólogos, cirujanos, patólogos, radiólogos y, cuando proceda, biólogos moleculares.

La familia de los Tumores de Ewing (ESFT) es un conjunto de tumores, pertenecientes al grupo de los tumores de cariotipo sencillo, que ejemplifica la diversidad que pueden tener los sarcomas. Esta familia engloba distintas entidades con morfología y diferenciación heterogéneas pero que comparten características fenotípicas y moleculares.

Introducción

En este grupo se incluyen los Sarcomas de Ewing (SE), los tumores neuro-ectodérmicos primitivos (PNET) ó el Tumor de Askin, entre otros que, en el inicio del siglo XX, se han descrito como entidades clínico-patológicas distintas pero que, en años posteriores, se han englobado en un único grupo.

“Todo empezó” cuando, en el año de 1918, Arthur Purdy Stout describió un tumor en el nervio cubital, con características correspondientes a un sarcoma pero que era compuesto por células pequeñas, ordenadas en una estructura con forma de rosetas (7), lo que se describió *a posteriori* como un PNET periférico. 3 años después James Ewing describió un tumor indiferenciado en la diáfisis del los huesos largos de una niña de 14 años, que era radio-sensible (8). Con el paso de los años, se han ido acumulando diversos casos de tumores de células pequeñas redondas, los cuales se han descrito inicialmente como endoteliomas difusos del hueso (8), después como mielomas endoteliales del hueso (9), entre otros. Como todas estas entidades compartían diversas características, especialmente el hecho de que poseían translocaciones entre el gen EWS y un factor de transcripción de la familia ETS, se decidió englobarlos todos dentro de los Sarcomas de Ewing (SE) (10).

Los SE son la segunda neoplasia más frecuente en los tumores primarios del hueso de niños y adolescentes (16% de los tumores malignos), después de los osteosarcomas, en los que la supervivencia a los 5 años es apenas del 50% (11-15). Aún así, son bastante infrecuentes, con una incidencia anual del 1-3/millón, con una cierta predominancia en el genero masculino y la raza caucásica (6, 16-18).

Este tipo de tumores aparece en los huesos, especialmente en la pelvis, los huesos largos y los huesos de la caja torácica, pero un 15% de estos sarcomas puede encontrarse también en partes blandas (zonas extra-óseas), como los riñones, vejiga, próstata ó meninges. Las metástasis primarias se encuentran especialmente en los pulmones, huesos y medula ósea (19, 20).

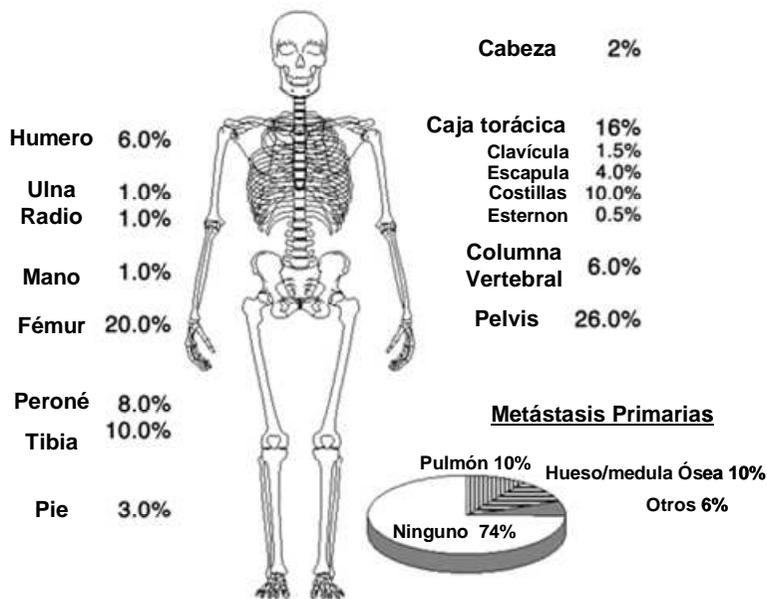


Figura 1: Zonas tumorales primarias de los Sarcomas de Ewing y los órganos donde más frecuentemente se detectan metástasis. Adaptado de Bernstein et al. (19)

La histogénesis de los SE es todavía desconocida. Debido a su nivel de diferenciación muy bajo, se torna difícil determinar cual es el origen de estos tumores. Por un lado, existen evidencias de que podrían derivar de la cresta neural, ya que expresan determinados marcadores neurales y que poseen un patrón de diferenciación neural bajo determinados estímulos (21-27). Sin embargo, también se apunta en un posible origen mesenquimal

Introducción

indiferenciado en el que se da la transformación celular (28, 29). Se ha visto que el gen de fusión EWS-FLI1 transformaba células mesenquimales progenitoras en células pequeñas redondas en modelos animales (30) y que bloqueaba la diferenciación de células pluripotentes del estroma medular, lo que está de acuerdo con la apariencia indiferenciada del SE (31). Sin embargo, estos datos ponen otra cuestión que todavía no se ha aclarado: ¿es el SE reflejo del fenotipo de una célula madre tumoral, cuya diferenciación se ha bloqueado por la actividad del gen de fusión EWS-ETS ó es el oncogén el que impone un programa de diferenciación incompleto en una célula precursora pluripotente?

1.1.1. Diagnóstico

Como se ha referido anteriormente, un diagnóstico correcto de los SE es esencial, siendo muchas veces complejo debido al bajo grado de diferenciación de estos tumores. Se debe tener una adecuada información clínica del paciente, junto con estudios morfológicos, inmunohistoquímicos o moleculares, si procede, de biopsias tumorales.

A nivel clínico, los SE presentan inicialmente un dolor e inflamación loco-regionales, siendo el dolor intermitente y variable de intensidad (32) y que, muchas veces, se confunde erróneamente con el dolor del “crecimiento óseo” ó el derivado de las actividades deportivas. En estos casos este tipo de dolor persiste durante la noche y dura más de un mes, lo que indica que ninguna de estas posibilidades es correcta. Este dolor es apenas un síntoma inicial que puede ser seguido por una masa palpable, tardándose en media 3-9 meses hasta obtener un diagnóstico definitivo. También se pueden registrar otros síntomas, como la tendinitis, la inflamación de la cadera, la osteomielitis, la leucocitosis, fiebre ó anemia y

pérdida de peso, dependiendo de la zona donde se encuentra el tumor primario y del grado de evolución de ese mismo tumor (19, 32, 33). Es de práctica común empezar por estudiar la posible lesión ósea con rayos x en dos planos, donde se observa una destrucción del hueso, seguidos de estudios más detallados por resonancia magnética



Figura 2: Imágenes de rayos x y resonancia magnética de un paciente de SE, donde se puede apreciar la afectación del hueso y los tejidos circundantes.

A nivel morfológico, los SE están compuestos por “sábanas” de células pequeñas y redondas, con un núcleo prominente y citoplasma eosinófilo de menor proporción, con alto grado de proliferación y con casi ausencia de matriz extracelular. Se puede detectar alguna diferenciación neural por la presencia de rosetas de Homer-Wright y/o alguna diferenciación epitelial por la presencia de células con un citoplasma denso y membranas celulares prominentes. En cualquiera de estos casos se detecta una positividad para el glicógeno PAS (ácido periódico de Schiff) (6, 16, 19).

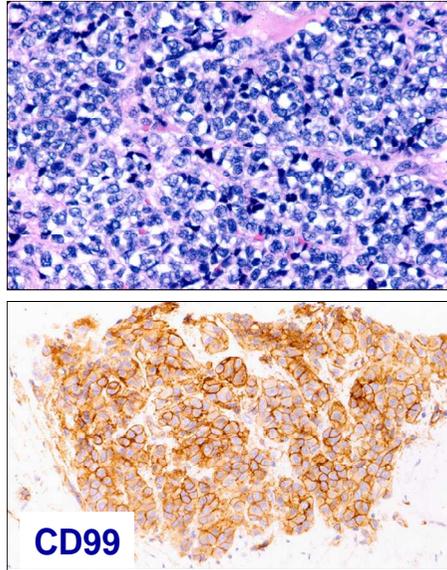


Figura 3: Estudio morfológico e Inmunohistoquímico de una biopsia de un paciente con SE, con tinción para PAS y CD99. Se puede observar el patrón de células pequeñas, redondas, con poco citoplasma y un marcaje con patrón de membrana para CD99.

A nivel inmunohistoquímico se verificó que más de un 95% de los casos de SE tienen un marcaje positivo para el receptor de adhesión CD99 (34-36) y aunque no se sepa ciertamente cual es su función en estos casos, se ha demostrado que su inhibición con anticuerpos monoclonales inducía la apoptosis, inhibiendo la proliferación e incrementando la sensibilidad a los agentes quimioterápicos de líneas celulares de los SE (37-39). Estos tumores también presentan reactividad para la vimentina (40-43) y, en un 20% de los casos, para citoqueratina (44-47). Algunos tumores más diferenciados pueden tener reactividad para determinados marcadores neuronales, como la enolasa neuronal específica (NSE) (48, 49), la proteína S-100, la sinaptofisina ó el CD57 (19, 40, 50-52).

Visto que las características histológicas e inmunofenotípicas de los SE se solapan entre ellas y también con otros tumores pediátricos de células pequeñas y redondas (como es el caso del neuroblastoma, del rhabdomyosarcoma, del linfoma de tipo no Hodgkin, entre otros) y que no existen marcadores específicos que los distingan entre ellos totalmente, en última instancia se recurre a la detección de las translocaciones cromosómicas específicas asociadas a cada uno de ellos. En estos casos se hacen estudios moleculares de RT-PCR (Retrotranscripción (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)) y/o FISH (Hibridación fluorescente *in situ*) para detectar las translocaciones del gen EWS con un elemento de la familia ETS (53-57). En el primer caso se amplifica y detecta el producto de la fusión EWS-ETS y en el segundo caso se hace una hibridación con sondas que detectan el gen EWS y/o sus “compañeros” de translocación, pudiéndose así distinguir los diferentes tipos de tumor.

1.1.2. Pronóstico

Como se ha citado anteriormente, uno de los factores pronósticos en los sarcomas es el grado/estadio del tumor.

En el momento del diagnóstico se debe verificar si el tumor sigue localizado ó si ya existen metástasis, una vez que su presencia es detectable en un 25% de los pacientes en el momento del diagnóstico, es uno de los factores de peor pronóstico (58-61). La ocurrencia de metástasis óseas ó medulares tiene peor pronóstico que las metástasis pulmonares (62-66).

Otro factor pronóstico es la localización y el tamaño del tumor. Se sabe que los pacientes con tumores pélvicos tienen peor pronóstico, ya que, entre otras causas, la enfermedad se detecta más tarde. Así, en el momento del diagnóstico, el tumor tiene ya un tamaño considerable (tumores con más de 200 cm³ se asocian a peor pronóstico) y se verificó que hasta en un 32% de los pacientes presenta metastatización del tumor (58, 67-69).

Introducción

También se ha verificado que el tipo de translocación que presenta el tumor tiene importancia pronóstica y que la presencia de cambios citogenéticos adicionales podrá tener un peor pronóstico. Se ha comprobado que pacientes con una fusión EWS-FLI1 tienen un mejor pronóstico y una tasa de supervivencia mayor respecto a los pacientes con fusiones EWS-FLI1 de otro tipo (70-72). También se demostró que pacientes con alteraciones genéticas adicionales, como las ganancias en los cromosomas 8, 12, 20, y 1q y pérdidas de los brazos 16q y 19q (73-77), tenían peor pronóstico (78, 79).

Pacientes sin metástasis en el momento del diagnóstico (n=73)

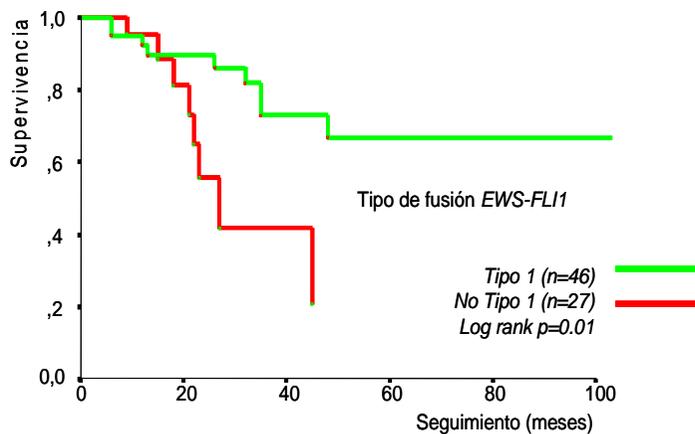


Figura 4: Curva de supervivencia de pacientes sin metástasis en el momento del diagnóstico, donde se demuestra la correlación del tipo de fusión con el pronóstico. Los pacientes con fusión de tipo1 tienen una tasa de supervivencia mayor que los demás pacientes. Adaptado de de Álava et al. (71).

1.1.3. Terapia

La cura de los SE puede ser alcanzada únicamente con quimioterapia y control local (radioterapia y cirugía).

Inicialmente se empieza por quimioterapia adyuvante preoperatoria (con el fin de eliminar micro-metástasis, reducir el tamaño del tumor a extirpar y comprobar la eficacia del tratamiento), seguida de terapia local y quimioterapia adyuvante complementaria.

Durante muchas décadas se utilizó la radioterapia como modalidad de tratamiento local, pero, actualmente, la cirugía ortopédica mantiene la función e incrementa la “conservación” de los miembros, sin comprometer la supervivencia, lo que hace que se utilice más esta segunda modalidad (80, 81).

Inicialmente, en los años 60, los SE eran tratados con ciclofosfamida (82-84), siendo posteriormente tratados con una combinación de ciclofosfamida, vincristina y radioterapia (85). En los años 70 se introdujo una terapia cuádruple, donde se combinaban vincristina, actinomicina D, ciclofosfamida y doxorubicina (esquema VACD), con un incremento de la supervivencia de los pacientes (86), tornándose el esquema VACD en el estándar de la terapia convencional. Basándose en los resultados publicados de la combinación de ifosfamida con etoposido (87, 88), al final se seleccionó el esquema de combinación de 5 fármacos (VDC-IE) como terapia convencional en los EEUU. En Europa, se usa el esquema VIDE, que se basa en los estudios del EURO-E.W.I.N.G. (89).

A pesar de todo, no existe ningún tratamiento realmente efectivo en la actualidad y un 30-40% de los pacientes con enfermedad localizada y un 80% de los pacientes con metástasis muere debido a la progresión de la enfermedad (61, 64, 90, 91). Por ello, la búsqueda de nuevas modalidades de tratamiento y nuevas dianas terapéuticas es una necesidad urgente en el tratamiento de los SE.

1.1.4 Genes de Fusión

Como se cita anteriormente, los SE poseen translocaciones, que, de manera análoga a lo que ocurre en numerosas leucemias y algunos linfomas, originan fusiones génicas específicas. En estos casos, se da la fusión del gen EWS con un factor de transcripción de la familia ETS (normalmente FLI1 ó ERG), que tiene una estructura de unión al ADN única. Las proteínas quiméricas generadas son factores de transcripción aberrantes que promueven el fenotipo oncogénico de las células de SE (70, 71, 92-96).

1.1.4.1 EWS-FLI1

La translocación $t(11;22)(q24;q12)$ ocurre en un 85-90% de los casos del SE (97, 98), produciéndose la fusión del gen EWS (en el brazo q12 del cromosoma 22) con el gen FLI1 (en el brazo q24 del cromosoma 11) (95, 99-102). En estos casos, la porción distal del gen FLI1 es yuxtapuesta con la región proximal del gen EWS, creando el gen de fusión EWS-FLI1 con la región amino-terminal de EWS y la región carboxi-terminal de FLI1.

Dependiendo de la zona del corte, se obtienen diversos tipos de fusión, siendo los más comunes los cortes en los exones 7 y 10 de EWS y 5 y 6 de Fli1 (la fusión de tipo 1 es 7-6, la tipo 2 7-5 y la tipo 3 10-6). De todos modos, todas las translocaciones incluyen los exones N-terminal de EWS (exones 1-7) y el dominio de unión al ADN de Fli1 (exón 9).

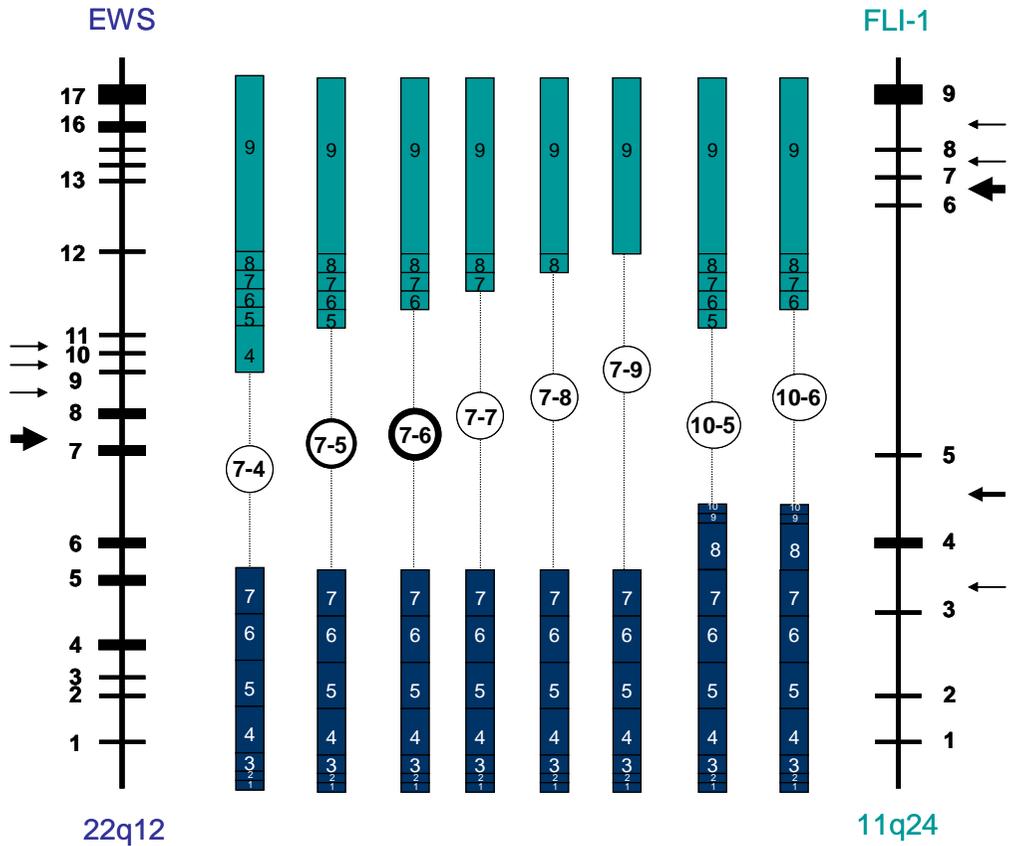


Figura 5: Representación de los genes EWS y FLI1 y las fusiones más comunes resultantes de la translocación t(11;22). Las flechas indican las zonas de “breakpoint” más comunes.

El EWS es un gen constituido por 17 exones, a lo largo de 40kb del ADN (103, 104), que codifica una proteína de 656 aminoácidos de función desconocida. Pertenece a la familia de las proteínas TET, que comparten un dominio RRM/RNP-CS de 87 aminoácidos, que está implicado en la unión específica proteína-ARN (105, 106). Este dominio se encuentra en la región amino-terminal de EWS y es codificado por los primeros 7 exones; el dominio se mantiene en las proteínas de fusión. Se cree que esta región actuará como un dominio de activación transcripcional (107, 108). Las proteínas TET comparten también un número variable de repeticiones RGG (arginina-

Introducción

glicina-glicina), en la región carboxi-terminal, que se cree que reconocen y promueven la unión al ARN (107). Por esto, se cree que las proteínas TET, como EWS, TLS/FUS, hTAFII68, entre otras, están implicadas en la transcripción y procesamiento del ARN.

Aunque no se sepa con claridad la función biológica de EWS “wild-type”, se cree que está involucrada en la transcripción del ARNm. Se ha verificado que se une el ARN *in vitro* (107), y que, junto con TAFII68, forma complejos con el factor de transcripción TFIID, la RNA polimerasa II y el co-activador CBP/p300 (105, 106).

EWS es una proteína expresada en un grupo en células de mamíferos, con una gran homología entre diferentes especies, lo que sugiere que tendrá una función importante. Se localiza predominantemente en el núcleo pero puede cambiar de localización bajo determinados estímulos (109, 110).

El gen FLI-1 fue el primer “compañero” de translocación de EWS conocido en los SE. Es miembro de la familia de factores de transcripción ETS, implicados en el control de la proliferación celular, desarrollo ó tumorigénesis (111-113). Todos los miembros de esta familia comparten un dominio altamente conservado, con 85 aminoácidos, que media la unión específica a regiones de ADN ricas en purina, con la secuencia consenso GGAA/T (114), creyéndose que están implicados en establecer la especificidad para determinados promotores, y en modular la regulación transcripción al (111-113). El gen FLI1 tiene ese dominio en la región carboxi-terminal. En la región amino-terminal posee un dominio de estructura tipo hélice-vuelta-hélice, responsable por la interacción proteína-proteína (115).

Durante el desarrollo, FLI-1 es expresado en células hematopoyéticas y endoteliales y en los tejidos adultos su expresión se restringe a células hematopoyéticas, con altos niveles de expresión en el timo e hígado (116).

Se ha visto que FLI-1 está implicado en el desarrollo de los megacariocitos (117), en la vasculogénesis (118), en la regulación del ciclo celular al reprimir la expresión de la proteína retinoblastoma (119) y en la promoción de la proliferación al inducir la expresión de Bcl2 (120).

De un modo global, se puede decir que una fusión EWS-ETS modula la expresión de sus genes diana de un modo secuencia-especifica, reconocido por el componente de la familia ETS y bajo el potente control transactivador de EWS. De este modo, diríamos que los genes diana de EWS-FLI1 serían los genes diana de FLI1. Sin embargo, esto no es del todo cierto. Se ha visto que las dianas de la acción de la proteína de fusión dependen también de interacciones proteína-proteína, únicas de la molécula quimera, lo que resulta en un espectro de dianas bastante más amplio que el de FLI1 (121). Además, se ha visto que EWS-FLI1 era un potente transactivador cuando co-transfectado con genes "*reporter*" que contenían las regiones de unión a ETS, demostrando que la activación transcripcional depende de ambos componentes de la quimera.

Se sabe actualmente que la expresión de EWS-FLI1 tiene como genes diana a EAT2, mE2-C, MYC, CCND1, PDGFC, DAX1, p21, p57kip, TGFRII ó IGFBP3, entre otros (94, 122-133). De este modo, EWS-FLI1 actúa como agente antiapoptótico y pro-proliferativo (134, 135), cambiando incluso la diferenciación de neuroblastomas a ES (135, 136) y activando la telomerasa en SE (137).

1.1.4.2. Otros tipos de fusión

Aunque sean más raro, EWS también se encuentra translocado con otros elementos de la familia ETS en los SE. Se ha detectado en un 5-10% de los casos de SE una translocación $t(21;22)(q22;q12)$, con fusión EWS-ERG (138, 139) y en los restantes 5% se han detectado translocaciones $t(7;22)(p22;q12)$, con fusión EWS-ETV1; $t(17;22)(q12;q12)$ con fusión EWS-E1AF y $t(2;22)(q13;q12)$, y con fusión EWS-FEV. Incluso se ha detectado una inversión $inv(22)$, con fusión EWS-ZSG (140-144). En cualquier de estos casos, estas fusiones dan también lugar a SE.

1.1.4.3. Otras alteraciones

Como se ha descrito anteriormente, en los SE existen, más allá de las proteínas de fusión que se producen con las distintas translocaciones, otro tipo de alteraciones genéticas responsables también por el fenotipo maligno de estos tumores. Se ha visto, por estudios de citogenética convencional, una ganancia de los cromosomas 8 y 12 y una pérdida de 1p (73, 78). Se verificó también una pérdida de p21/WAF (145, 146) y pérdida o mutación de p16/INK4 (147-149), en un 20-30% de casos. Aunque sea raro, se ha verificado en un 5-15% de casos, una mutación en p53, que define un grupo de pacientes con peor pronóstico (145, 148, 150, 151). También se ha detectado un fallo del control del ciclo celular por pérdida del “checkpoint” en la fase G1 (148, 152, 153).

1.1.5 Rutas autocrinas

A las translocaciones que se producen en el SE y que son, por lo menos en parte, responsables por la patogénesis de estos tumores, se añaden otras alteraciones moleculares, también implicadas en la tumorigenicidad del SE, como es el caso de la expresión/activación desregulada de distintos *loops* autocrinos.

Se ha demostrado en los últimos años la implicación de las rutas de transmisión de señales de IGF1R (*Insulin-like-Growth-Factor 1 Receptor*) y c-kit en la patogénesis del SE (154-162). Se sabe que la activación de estas rutas desencadena la estimulación de señales intracelulares que, a su vez, son responsables por la desregulación de distintos procesos celulares, como son el crecimiento celular, la protección de la inducción de la apoptosis y la diferenciación, entre otros. Sin embargo, estos mecanismos están muy poco estudiados en este tipo de sarcoma, desconociéndose todavía cómo se desencadenan y, principalmente, cómo se integran y complementan, siendo de elevado interés el estudio de su implicación en el SE.

1.1.5.1 Ruta de señalización del IGF1R

La ruta de señalización del IGF1 (*Insulin-Like-Growth Factor 1*, Factor de Crecimiento Similar a Insulina 1) ha aparecido desde muy temprano en la evolución, posiblemente como reguladora de la proliferación celular, en función de la disponibilidad de nutrientes (163). Esta función se ha conservado en los mamíferos e IGF1 sigue teniendo un papel esencial en la señalización de la supervivencia y proliferación celulares (164, 165). Se sabe que una alteración de la expresión de los componentes de esta ruta de señalización está implicada en el desarrollo y progresión del fenotipo tumoral en diversos tipos de cáncer, incluyendo los sarcomas (154, 166, 167), por lo que el estudio de este sistema tiene especial interés

1.1.5.1.1 El ligando IGF1

El IGF-1 (originalmente llamado somatomedina C) es un factor de crecimiento estructuralmente similar a la insulina (60% de homología), pero que es sintetizado por diversas células y secretado inmediatamente tras su síntesis (y no almacenado intracelularmente como la insulina). Se produce básicamente en el hígado (en el riñón también), en respuesta a la hormona, del crecimiento (GH), como un péptido monocatenario de 70 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares y tiene un peso molecular de 7,649 kDa (168-170).

Actualmente se sabe que la principal función del IGF-1, tanto autocrina como paracrina, es mediar los efectos pro-proliferativos de la glándula pituitaria, controlando el crecimiento y la diferenciación de diversos órganos/tejidos, en especial el tejido muscular, el hígado, el riñón, nervios, piel y pulmón (165, 171-174). No obstante, su acción principal consiste en el desarrollo óseo: además de estimular la proliferación celular de los condrocitos, les hace sintetizar colágeno para la matriz ósea (175-181).

1.1.5.1.2 El receptor IGF1R

El IGF1R es un receptor transmembrana ubicuo, conservado a lo largo de la evolución, que pertenece a clase II de los receptores de la familia de los receptores tirosina cinasa (RTK) (junto con el receptor de insulina). Su gen se encuentra en el brazo q26 del cromosoma 15, a lo largo de 11242 pares de bases, con 21 exones y codifica una proteína de 95KDa (182, 183).

El IGF1R es estructuralmente similar al receptor de Insulina (IR), con un 70% de homología, especialmente en el dominio tirosina cinasa (84%), pero también es marcadamente distinto en otras regiones, como en la región carboxi-terminal (44%) ó en el domino transmembrana (22-26%) (182,

184). Es compuesto por dos subunidades extracelulares alfa y dos subunidades intracelulares beta. Las subunidades alfa unen el ligando mientras que las subunidades beta transmiten la señal inducida por el ligando (Figura 6). Las subunidades beta contienen 3 dominios principales: el dominio juxtamembrana, el dominio tirosina-cinasa y el dominio carboxi-terminal.

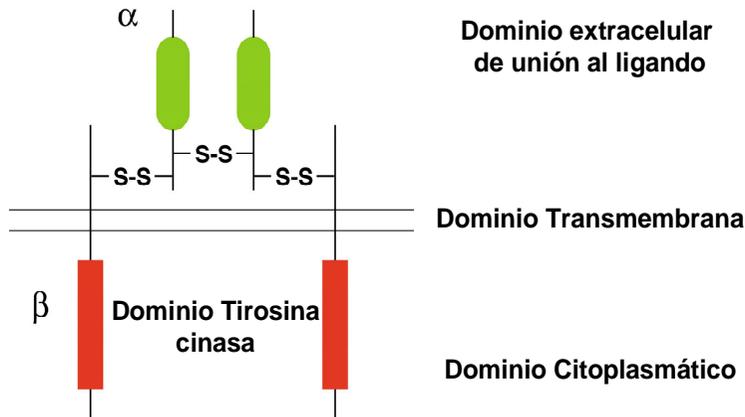


Figura 6: Estructura simplificada del IGF1R, donde se pueden apreciar los 3 dominios de IGF1R, con la estructura $\alpha_2\beta_2$.

La unión del ligando induce un cambio conformacional del receptor, llevando a la oligomerización de dos ó más receptores y, por interacción receptor-receptor, a la trans-fosforilación de diversos residuos en el dominio citoplasmático (las tirosinas 1131, 1135 y 1136 del dominio tirosina cinasa, la tirosina 950 del dominio juxtamembrana y las tirosinas 1250/1251, 1316 y las serinas 1280-1283 del dominio carboxi-terminal) (185-187). Estos procesos de fosforilación reclutan a moléculas intermediarias/adaptadoras de la señalización de IGF1R, como son los sustratos del IR 1-4 (IRS 1-4) ó las proteínas Shc (*src and collagen-homology protein*), desencadenando diversas señales intracelulares a través de las ruta de la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K)/AKT ó la de la proteína cinasa activada por mitogeno (MAPK)(188-192) (que se describe más detalladamente a continuación, en el apartado 1.1.5.1.4.).

1.1.5.1.3. Las proteínas de unión a IGF

La biodisponibilidad de los ligandos de IGF1R depende directamente de la concentración de las proteínas de unión a IGF's (las IGFBP). Existen descritas 6 IGFBPs (IGFBP 1-6), que son producidas en el hígado, con 22-31kDa, encontrándose tanto en la circulación sanguínea como en algunos fluidos extravasculares (193). Más del 95% del IGF1 circulante se encuentra unido a la IGFBP3, que incrementa largamente la vida-media de este factor de crecimiento (194, 195).

La función de las IGFBPs varía según el tipo de célula pero, de una manera global tanto pueden incrementar como reducir la señalización del IGF1R, visto que ó inhiben la unión de los IGFs al receptor ó incrementan la vida-media de los IGFs, estando todavía por aclarar en que situaciones se dá cada caso.

1.1.5.1.4. La cascada de señalización

Como se ha dicho anteriormente la activación de la cascada de señalización de IGF1R promueve (dependiendo del contexto celular) una inducción del crecimiento, proliferación, supervivencia y/ó diferenciación celulares, principalmente (pero no exclusivamente) a través de las rutas de AKT y MAPK.

Tras la unión del ligando al IGF1R y su trans-fosforilación, se da a continuación la fosforilación de sus proteínas sustrato (IRS y Shc), que sirven de nodos de señalización para distintas rutas intracelulares.

En el caso del IRS-1, se da el reclutamiento y fosforilación de PI3K, que a su vez fosforila y activa otras proteínas cinasa, como AKT, p70rsk ó PKC (196). AKT fosforila y bloquea un largo panel de proteínas pro-apoptóticas, como son BAD, la caspasa 9, la cinasa GSK-3 beta, entre otras

e induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl2 (197-199), estimulando así la supervivencia celular.

Otra ruta de señalización activada por IGF1R, relacionada esencialmente con el control transcripcional, es la que recluta la proteína Sos para ambas IRS-1 y Shc. Esto induce una activación de la proteína Ras que a su vez activa la proteína Raf, activándose así la cascada de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (200, 201).

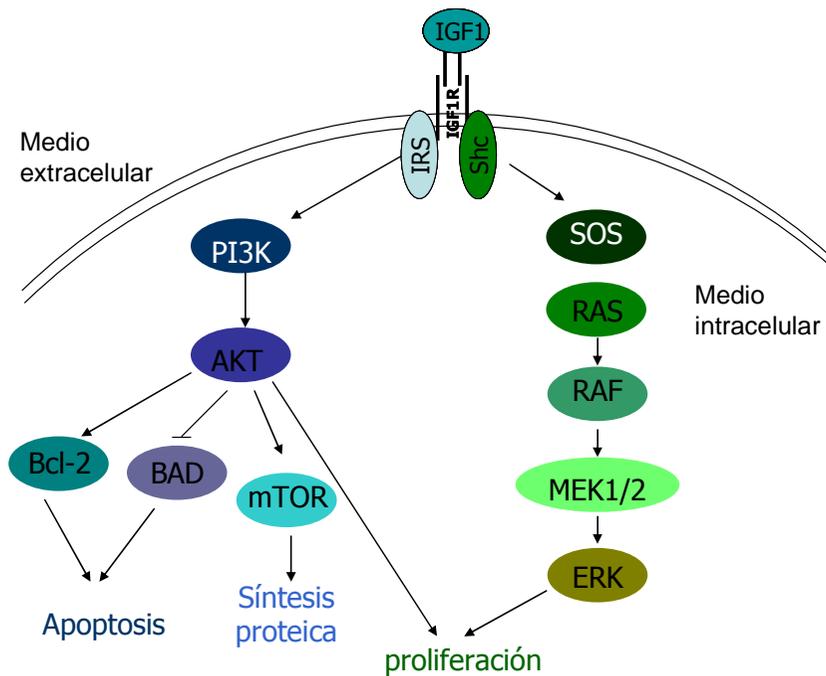


Figura 7: Representación esquemática simplificada de la ruta de señalización de IGF1R. La activación del receptor tras unión con el ligando induce una activación de distintas rutas de señalización intracelular, como es el caso de la ruta de PI3K/AKT ó la de las MAPK, lográndose así un bloqueo de la apoptosis y estimulación de la supervivencia celular.

La activación de la ruta de IGF1R está también implicada en la activación de otras cinasas de la familia de las MAP (*mitogen-activated protein*) cinasas, además de ERK1/2, como es el caso de las cinasas *Jun1/2* (202) ó la MAP cinasa p38 (203).

1.1.5.1.5. IGF1R y cáncer

Como ya se ha referido anteriormente, el sistema de IGF1 está implicado en la regulación de la proliferación y apoptosis celulares, en condiciones fisiológicamente normales. Sin embargo, se ha detectado una sobre actividad de esta ruta en diversos tipos de cáncer (204), como son el cáncer de próstata (205), de colón (206), de páncreas (207), de pulmón (208), de mama (209, 210) ó el melanoma (211-213). En estos casos, se pueden tener un incremento en los niveles circulantes de IGF1 (214-217) y/ó una sobre-expresión de IGF1R, con una unión excesiva del IGF1 a un mayor número de IGF1R. De este modo, se desencadena la sobre-activación de varias cascadas de señalización, con una desregulación de varios procesos celulares, como son el control del crecimiento celular (154, 167, 214), la protección de la apoptosis (188-190) ó la inducción de diferenciación (envolviendo moléculas como mTOR) (218). Esta ruta también regula la angiogenesis a través del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), incluso cuando esta molécula no es una diana directa de la ruta IGF1R, estando también involucrada en la vasculogénesis tumoral (219).

También se ha visto que la ruta del IGF1R está directamente involucrada en el crecimiento y supervivencia del SE, promoviendo la proliferación y supervivencia celulares, con reducción de los niveles de apoptosis (192, 218-222). Se ha demostrado que el bloqueo de IGF1R reducía la tumorigenicidad y las propiedades metastáticas de las células del SE (208, 221, 223-228), por lo que se convierte en una posible diana terapéutica de esta neoplasia de especial interés y la cual todavía hay que estudiar en más detalle.

1.1.5.2 Ruta de señalización de c-kit

En la última década se ha detectado una activación patológica de varios RTK en estudios clínicos y pre-clínicos en el SE. Uno de estos receptores es exactamente c-kit.

1.1.5.2.1 El ligando SCF

El factor de crecimiento de las células madre (SCF) es el ligando de c-kit y es un factor de crecimiento importante para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, producido por fibroblastos y mastocitos (229-233).

Su gen se encuentra localizado en el brazo q21.32 del cromosoma 12 y codifica una proteína de 30kDa (234).

El SCF existe en dos formas: unido a la superficie celular ó soluble, siendo que la forma soluble se produce por un corte de la forma unida a la membrana, por metaloproteasas (235, 236).

1.1.5.2.2 El receptor c-kit

c-kit también llamado CD117, es un receptor de membrana, perteneciente a la clase III de los RTK (junto con el PDGFR, alpha y beta, FLT3 y GM-CSF)(237). Su gen se encuentra en el brazo q12 del cromosoma 4, adyacente a su homólogo PDGFRa, a lo largo de 89kB, con 21 exones (238, 239) y codifica una proteína de 110k Da.

La estructura proteica de c-kit comprende un dominio extracelular, (que tiene cinco vueltas de tipo inmunoglobulina), un dominio transmembrana, un dominio juxtamembrana y un dominio tirosina cinasa (interrumpido por la inserción de una región hidrofílica) (Figura 8).

Introducción

La unión de SCF al dominio extracelular promueve la dimerización de dos receptores, induciéndose la trans-fosforilación de los residuos de tirosina del dominio catalítico de estos receptores. De modo análogo a lo que ocurre con IGF1R, esta activación induce una fosforilación y activación de diferentes rutas de señalización intracelular (como la cascada de las MAPK ó AKT), controlándose así la proliferación, apoptosis, diferenciación, adhesión y movilidad celulares (240).

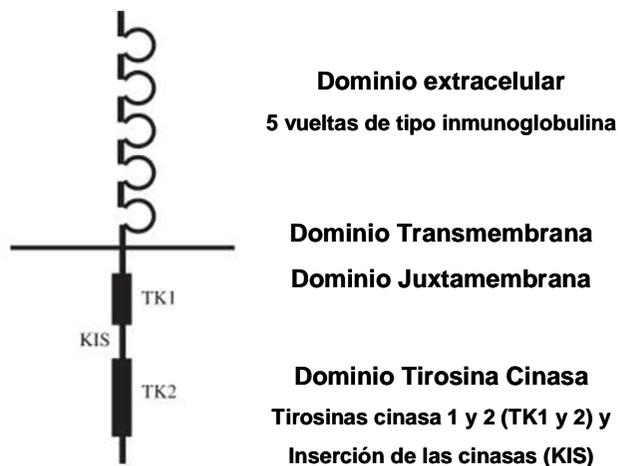


Figura 8: Representación gráfica de la estructura de c-kit con sus diferentes dominios. La región amino-terminal es la que se encuentra en la parte de arriba y la carboxi-terminal en la parte de abajo. Adaptado de Miettinen y Lasota (161).

Se han descrito mutaciones activantes de c-kit en diversos tumores, siendo el caso de los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) el más estudiado, con un 60-70% de casos positivos (241-245). Estas mutaciones promueven una fosforilación constitucional de c-kit y la activación de cascadas de señalización intracelular independiente de ligando, siendo las más comunes las que se localizan en los exones 9, 11, 13 y 17, que corresponden al dominio extracelular, jxtamembrana y tirosina cinasa, respectivamente (246-249).

1.1.5.2.3 La ruta de señalización

Tras la dimerización de c-kit y su consecuente trans-fosforilación (después de la unión del SCF), ocurre la activación de distintas cascadas de señalización, de modo análogo a lo descrito para IGF1R. La cascada de PI3K/AKT es la más descrita en estos casos. Sin embargo, se sabe que también se activan otras cascadas, como las de JAK/STAT y las de las MAPK, controlándose así la proliferación, diferenciación y muerte celular.

En el caso de la activación de la ruta de las JAK/STAT, se ha demostrado la fosforilación y activación de JAK2 y STAT1, 3 y 5 (250-254).

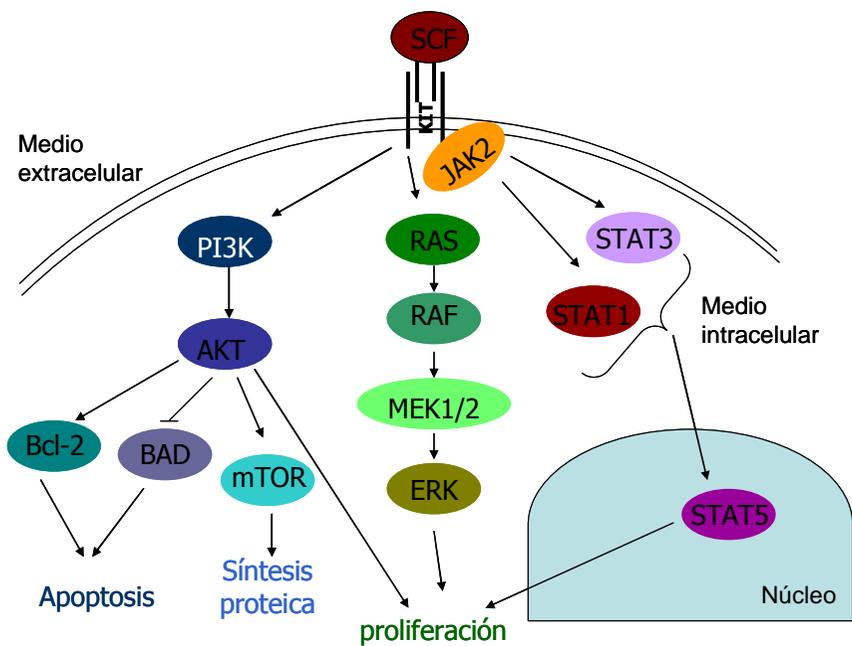


Figura 9: Representación esquemática simplificada de la ruta de señalización de c-kit. La activación del receptor tras unión SCF induce una activación de distintas rutas de señalización intracelular, como es el caso de la ruta de PI3K/AKT, la de las MAPK ó la de las JAK/STAT, lográndose así un bloqueo de la apoptosis y estimulación de la supervivencia celular.

1.1.5.2.4. c-kit y cáncer

En condiciones fisiológicas normales, c-kit se encuentra expresado en células progenitoras hematopoyéticas, células intersticiales de cajal y células del epitelio de la glandula mamaria (255-264). En estas condiciones esta proteína es esencial para el desarrollo hematopoyético, la gametogénesis, el crecimiento y la diferenciación de las células intersticiales.

Se ha identificado la expresión de c-kit y/ó el SCF en diversos tumores, como en el carcinoma de pulmón de células pequeñas, los tumores del estroma gastrointestinal, los melanomas, los neuroblastomas e incluso en el SE (265-269).

En el caso del SE, se ha detectado la existencia de un circuito autocrino funcional de SCF/KIT, implicado en la supervivencia, proliferación y apoptosis celulares (158-162). No se han encontrado mutaciones de c-kit en estos casos, siendo la activación del c-kit dependiente de ligando (155, 162).

Sin embargo, recientemente se ha cuestionado la relevancia de c-kit en el SE una vez que su inhibición en poco mejoraba el tratamiento de este tipo de tumores (se cree que la ausencia de mutaciones en c-kit hace que no sea esencial para el crecimiento celular de SE). No obstante, estudios *in vitro* han demostrado resultados interesantes al inhibir c-kit junto con el IGF1R (208, 228, 270), sugiriendo posibles usos en la terapia clínica, por lo que no es de descartar simplemente el estudio de la implicación de c-kit en el SE.

1.2. Respuesta al stress

Tras exposición a daños externos (que favorecen el plegaje inapropiado de determinadas proteínas y su consecuente degradación), para “defenderse”, las células de diversos tejidos incrementan drásticamente la producción de un pequeño grupo de proteínas, conocidas como las proteínas de respuesta al stress ó de choque térmico (HSPs). Estas proteínas son chaperonas que actúan, de una manera global, como “guardianes” del proteoma, facilitando el correcto plegamiento proteico (271), regulando la homeostasis celular.

1.2.1. HSPs

Las HSPs son polipéptidos expresados de manera ubicua y altamente conservados, desde las bacterias, pasando por las plantas, hasta los humanos. Fueron identificadas por Ritossa en el año 1962, como genes sobre-expresados en respuesta al stress en *Drosophila* (272). Desde entonces un gran número de investigadores ha estudiado estas proteínas y se demostró que estas actúan como mecanismo de defensa tras determinado stress, inducido por la temperatura, una inhibición del metabolismo, por alcoholes, metales pesados, stress oxidativo, inflamación, entre otros (273, 274). Actualmente se sabe que estas proteínas mantienen la estabilidad de sus proteínas cliente, renaturan las proteínas desplegadas ó inducen su degradación (275-277).

Las HSPs se clasifican en 6 diferentes familias, de acuerdo con sus pesos moleculares: familia de HSP100, familia de HSP90, familia de HSP70, familia de HSP60, familia de HSP40, y familia de las HSP pequeñas (278).

Introducción

Aún que las HSP sean abundantes, es muy raro que actúen solas. De una manera global, las chaperonas actúan como componentes de una maquinaria que tienen ellas mismas, junto con proteínas co-chaperonas, moduladoras de la actividad ATPasa y varias otras proteínas accesorias. Al contrario de las cinasas, las chaperonas no modifican covalentemente sus sustratos, sino que interactúan con sus proteínas cliente de una manera cíclica, dependiente de varias rondas de hidrólisis del ATP.

Se ha verificado que las HSP están muchas veces sobre-expresadas en tejidos neoplásicos ó líneas celulares cancerigenas (271, 279-282). En adición a su actividad de re-ensamblaje protéicos, ellas están también involucradas en la regulación de la apoptosis, del crecimiento celular y de la resistencia a fármacos anti-cancerigenos, habiéndose demostrado una correlación directa entre los niveles de las HSP y la progresión tumoral (282). Esto se debe a que muchas de sus proteínas cliente están involucradas en rutas de señalización que controlan la proliferación, la apoptosis y el ciclo celular de diversos tipos de cáncer, (281, 282), siendo por lo tanto la inhibición de las HSP una nueva estrategia para inhibir múltiples rutas desencadenadas por receptores y que se encuentra en estudio actualmente.

1.2.2. HSP90

La HSP90 es una de las proteínas citosólicas más abundantes en los organismos eucariotas, correspondiendo a 1-2% de todas las proteínas solubles (en ausencia de stress) (283).

Se han descrito, en organismos vertebrados, dos genes distintos que codifican las isoformas inducible y constitutivamente expresadas de HSP90, (HSP90 α y β , respectivamente), siendo que el gen que codifica HSP90 α se encuentra en el cromosoma 14 y el de HSP90 β en el

cromosoma 6. Sin embargo, las diferencias funcionales entre ellas están todavía poco esclarecidas (284).

Al contrario de otras HSP, la HSP90 tiene un número relativamente pequeño de proteínas cliente, incluyendo esencialmente en ese grupo proteínas ó receptores cinasa y factores de transcripción. Este factor no influye en que esta chaperona tenga un papel central en el control de la proliferación, apoptosis y ciclo celulares, así como en funciones endocrinas e incluso en el desarrollo (285).

1.2.2.1 Estructura y función de HSP90

HSP90 es una proteína relativamente grande, con 3 principales dominios estructurales (286): un dominio amino-terminal con un sitio de unión a ATP y geldanamicina (287), un dominio central que se piensa que es al cual se unen las proteínas cliente (unido al dominio amino-terminal por una región de unión altamente cargada) (288) y un dominio carboxi-terminal, que contiene una secuencia MEEVD y que se cree que es responsable por la unión de las proteínas co-chaperonas (289).

La HSP90 puede existir como homodímero, heterodímero ó en un complejo multi-proteico con otras proteínas co-chaperonas, como es el caso de HSP40, HSP70, Hop ó p23 (271). Se cree que la dimerización, así como en otras familias de HSPs, es ATP-dependiente, sino que en este caso la región amino terminal de unión a ATP tiene una estructura muy única, rica en adenina y conocida como la vuelta *Bergerat*, característica de la superfamilia GHKL (290), dando lugar a modelos conflictivos de cómo la hidrólisis del ATP a ADP afecta a la dimerización (288).

Introducción

Así como las demás HSPs, la HSP90, en condiciones normales actúa como protectora de las células que han sufrido un stress, manteniendo el correcto plegaje de sus proteínas cliente.

De una manera simplificada, lo que ocurre en el ciclo de “*chaperoning*” de HSP90 es un conjunto de pasos secuenciales en los cuales las proteínas cliente (PC) (en su gran mayoría receptores de hormonas, SHRs) pasan por complejos multi-proteicos que las mantienen con su correcto plegaje y así listas para ser activadas (Figura 10). Inicialmente, las PC se unen a HSP70, HSP40 y HIP formándose un complejo inicial. A continuación la proteína HOP recluta este complejo y HSP90, formándose de este modo el complejo intermedio. Lo que ocurre en este paso está poco detallado pero se cree que los componentes asociados a HSP70 se liberan del complejo y se da la entrada de ATP y p23. En este punto, y de un modo ATP-dependiente, la HSP90 expone completamente el dominio de unión a ligando de la proteína cliente, p23 estabiliza la unión de ATP a HSP90, y las inmunofilinas entran en el complejo, formándose el complejo final. En este punto, en la ausencia de ligandos la proteína cliente es liberada para entrar en nuevos ciclos de chaperoning y en el caso de que estos estén presentes esta une el ligando, dimeriza y activa sus rutas de señalización (271, 275) .

En el caso de que HSP90 esté bloqueada, la PC queda atrapada en el complejo intermedio, dándose el reclutamiento de la ligasa de ubiquitina E3, favoreciendo así la ubiquitinación y degradación de esa PC (291).

Introducción

Dos de las PC de HSP90 más importantes, proteínas clave en la fisiología normal, son AKT y p53.

En el caso de AKT, se ha demostrado que HSP90 une su forma fosforilada protegiéndola de ser inactivada por fosfatasas. De este modo AKT puede activar su cascada de señalización, inhibiendo la apoptosis y estimulando la supervivencia celular (292).

En el caso de p53, se ha descrito que HSP90 se une y estabiliza la expresión de la forma mutada de esta proteína, promoviendo el “*knocking-out*” de la función normal de la proteína silvestre. De este modo, se favorece la acumulación de mutaciones adicionales que facilitan la progresión de determinada enfermedad, como cáncer (293, 294).

1.2.2.3 HSP90 y cáncer

Diversas líneas de evidencia han demostrado la teoría de que los niveles de expresión de las HSP están drásticamente incrementando en numerosos tipos de cáncer, tanto sólidos como hematológicos (295-301).

En el caso de HSP90, evidencias cada vez más fuertes indican que en el contexto del cáncer esta proteína se encuentra en un estado “hiperactivo”, en los tejidos afectados cuando comparados con los tejidos normales próximos (302). En esta situación, el complejo multiproteico de HSP90 afectaría a la señalización intracelular, contribuyendo para la patogénesis de determinada enfermedad, induciendo el crecimiento celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la angiogenesis. De este modo, HSP90 estaría facilitando una “selección natural” de las líneas celulares más fuertes, permitiendo que las células cancerígenas resistieran a la presión selectiva que sufren a lo largo de la progresión de la enfermedad.

Con base en la estructura única de la región de unión a nucleótidos del dominio amino-terminal de HSP90, la diferencia en su actividad biológica entre células cancerígenas y normales, y la noción de que HSP90 estabiliza proteínas clave en el desarrollo oncogénico, se ha propuesto que HSP90 podrá ser una excelente diana terapéutica (303-305).

Actualmente existen disponibles inhibidores específicos de HSP90, como la Geldanamicina ó su derivado, el 17-allylamino-17-demethoxygeldanamicina (17-AAG). Este último está comenzando a ser probado en ensayos clínicos, con buenos resultados (306-310).

1.3. Terapia dirigida

La terapia convencional del cáncer, sin lugar a duda, está teniendo resultados excelentes en el incremento de la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, y a pesar de los beneficios derivados de su actividad antitumoral, la toxicidad asociada a este tipo de tratamiento reduce en mucho la calidad de vida de los pacientes. Además de esto, cada vez más se detecta la recidiva de tumores a causa del desarrollo de resistencia al tratamiento.

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido el estudio y desarrollo de nuevas posibles terapias, más específicas para cada tipo de tumor y dirigidas para procesos cancerígenos muy determinados, esenciales para la supervivencia del tumor, trayendo una nueva esperanza al campo del tratamiento en cáncer. Los nuevos agentes terapéuticos desarrollados pueden dividirse en dos clases: las moléculas pequeñas y los anticuerpos. En el caso de los anticuerpos monoclonales, éstos son capaces de inhibir una determinada proteína por reconocimiento de un antígeno específico y en el caso de las moléculas pequeñas, la proteína diana puede tener su expresión/función inhibida por moléculas inhibitoras de la actividad cinasa ó por ARN pequeños de interferencia (siARN).

1.3.1. Inhibidores de RTK

Como se cita anteriormente, los RTK desencadenan diversas rutas de señalización que están desreguladas en cáncer y que tienen un papel central en la progresión tumoral. Por este hecho, estas proteínas se han convertido en buenas dianas para el estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas.

En estos casos se utilizan dos aproximaciones de inhibición: por un lado se bloquean los receptores al inhibir la unión de sus ligandos y por otro se inactiva su actividad tirosina cinasa con moléculas pequeñas.

La unión del ligando a su receptor puede ser bloqueada por la utilización de anticuerpos monoclonales.

Los primeros anticuerpos monoclonales fueron desarrollados por Milstein y Kohler (311) y desde entonces su producción y aplicación han crecido de manera exponencial. Actualmente están disponibles anticuerpos monoclonales para numerosos RTKs, siendo el Rituxan/Rituximab (que inhibe CD20) y el Herceptin/Trastuzumab (que inhibe HER2) dos ejemplos de la actual aplicación clínica de esta modalidad de tratamiento (312-314).

La primera generación de moléculas inhibidoras de proteínas TK, las tirfostinas, tenían un rango de acción muy amplio. Algunas de ellas eran sustratos competitivos, otras ATP-competitivas y otras incluso bicompetitivas (sustrato y ATP) (315). Basándose en los resultados obtenidos con estas moléculas, los investigadores han apostado principalmente por el desarrollo de moléculas competitivas por ATP.

Actualmente se dispone de diversas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina cinasa de los RTK, como es el caso de Gefitinib (que inhibe EGFR/HER1) y Imatinib (que bloquea Bcr-Abl, PDGF y c-kit que ya se aplican en la terapia clínica (314, 316, 317).

1.3.1.1. Inhibidores de c-kit

Diversos esfuerzos se han puesto en el desarrollo y aplicación de inhibidores de c-kit. También en este caso se han probado diversos agentes inhibidores, como son los anticuerpos monoclonales ó los oligonucleótios anti-sentido, pero se ha visto que estos no lograban un total bloqueo de la activación del sistema de c-kit (265, 318). Con el desarrollo de las moléculas inhibitoras de la actividad cinasa de los RTK surgió una nueva posibilidad de inhibición de este receptor.

Las primeras moléculas utilizadas para inhibir la actividad tirosina cinasa de c-kit fueron las tirfostinas AG1269 y AG1295, pero no se han podido utilizar en la clínica debido a su poca especificidad y baja solubilidad (319) . Con estudios posteriores se verificó la posible aplicación de Imatinib en la inhibición de c-kit.

Aunque inicialmente se haya aplicado el Imatinib (Glivec ó STI571) en el tratamiento de Leucemia Mieloide Crónica, en el que inhibe la función de la proteína de fusión *bcr-abl*, se ha demostrado que, como inhibidor de la actividad tirosina cinasa de determinadas proteínas (IR, KIT y PDGFR) se puede utilizar en otros tipos de cáncer así como GIST, mastocitosis sistémica, cáncer de células pequeñas de pulmón ó glioblastomas de alto grado (320-322).

Su mecanismo de acción se caracteriza por ocupar el sitio activo de unión a ATP de las proteínas tirosina cinasas, inhibiendo por lo tanto la fosforilación de sus proteínas substrato y bloqueando las señales intracelulares desencadenadas por ellas (156). De este modo Imatinib es bastante selectivo ya que solo reconoce los sitios activos de *bcr-abl*, c-kit, IR y PDGFR y no cualquier TK.

Introducción

A nivel molecular se ha demostrado que el tratamiento con Imatinib conlleva a la inhibición de diversas rutas de señalización intracelular implicadas en proliferación y supervivencia celulares, como las de las MAPK, AKT, BCL-X, STAT3 ó β -catenina (155, 157, 253, 323-329).

Se ha verificado que la utilización de Imatinib en la inhibición de c-kit era especialmente relevante en aquellos casos de GIST que tenían una mutación activante de c-kit, por lo que actualmente está siendo aplica en la terapia de este tipo de pacientes (157, 330-333).

1.3.1.2. Inhibidores de IGF1R

En el caso de IGF1R, el mayor reto es lograr la inhibición específica de este receptor interfiriendo lo mínimo posible con el IR, sin provocar la diabetes.

Se ha probado la inhibición de IGF1R por la inhibición de la unión de su ligando, de su expresión y de su actividad tirosina cinasa. Actualmente se están utilizando diversos agentes bloqueantes, como es el caso de los anticuerpos monoclonales, de las moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad tirosina cinasa, de los péptidos que mimetizan IGF1, de los moduladores de la internalización del receptor, de los siARNs, entre otros (334).

En el caso del uso de anticuerpos, se ha verificado que el anticuerpo monoclonal alfa-IR-3 inhibía eficazmente IGF1R en carcinoma de mama, rabdomiosarcoma y SE (191, 335-337), pero en algunos modelos animales sus efectos se perdían (338). Resultados más prometedores se han obtenido con el anticuerpo anti-IGF1R-scFv-Fc, donde se verificó una inhibición de IGF1R tanto *in vitro*, como en xenograftos de cáncer de mama (339).

Los primeros compuestos inhibidores de la actividad tirosina cinasa de IGF1R descritos han sido las trifostina AG538 y I-OMeAG. Aunque inhibieran IGF1R, presentaban reactividad cruzada con el IR, por lo que se ha abandonado su estudio (340). De todos modos, se ha investigado mucho en este campo y, con la ayuda de la caracterización de las estructuras tridimensionales de IGF1R e IR y sus diferencias conformacionales en el estado fosforilado, actualmente se dispone de un panel considerable de inhibidores específicos de IGF1R, algunos de ellos incluidos en estudios pre-clínicos.

En lo que respecta a los péptidos que mimetizan IGF1, los moduladores de la internalización del receptor y los siARNs, se ha visto que el péptido JB1, los inhibidores de la catepsina CA074- y E64-metil-éster y algunos nucleótidos antisentido y siARNs inhibían la fosforilación/expresión de IGF1R, con efectos a nivel de la proliferación, supervivencia y ciclo celulares (170, 341-347).

1.3.2. Inhibidores de HSP90

Como se menciona anteriormente, debido a su papel importante en la estabilización de diversas proteínas oncogénicas, se ha puesto mucho esfuerzo en el desarrollo de diferentes inhibidores de HSP90. Estos incluyen productos naturales, como la ansamicina-benzoquinona ó el radiciol y sus derivados; moléculas pequeñas inhibidoras basadas en purina y otros compuestos sintéticos (282). Estos inhibidores se unen a la región de unión a nucleótidos del dominio amino-terminal de HSP90 con mayor afinidad que los nucleótidos naturales y evitan que la chaperona cicle desde su conformación de unión a ADP a la de unión a ATP, promoviendo así la degradación de las PC por la ruta de ubiquitina-proteosoma.

Introducción

De entre estos inhibidores, el 17-AAG, un miembro de la familia de las ansamicinas-benzoquinona, derivado de la geldanamicina, ha tenido resultados prometedores en estudios preclínicos, siendo la primera molécula a entrar en ensayos clínicos.

Dentro del grupo de los productos naturales, aún que con el radiciol no se hayan obtenido resultados satisfactorios en modelos animales (348), con sus derivados radester y pochonin D si que se ha logrado inhibir la función de HSP90 (349, 350). Con los derivados de la ansamincina-benzoquinona pasó algo similar, siendo el derivado de la geldanamicina, el 17-AAG, el compuesto que más suceso tuvo en la inhibición de HSP90.

Se ha visto en estudios animales que 17-AAG tenía la misma capacidad antitumoral que la geldanamicina pero que era menos tóxico (351), habiendo el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) patrocinado varios estudios de fase I, en los cuales demostró que la droga era bien tolerada (352). En estudios *in vitro* se ha demostrado que los efectos de 17-AAG pasan por una inhibición de la fosforilación de AKT, de Raf-1, de STAT3, del bloqueo de señalización de NF-kB, entre otros (353-359).

En el caso de las moléculas pequeñas inhibitoras basadas en purina y otros compuestos sintéticos, se han obtenido resultados interesantes con PU24F-C1 (360) y shepherdina (361), con efectos antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo*, afectando poco la viabilidad de las células no-cancerígenas.

1.3.3. Tratamientos combinados

A pesar de la obtención de resultados prometedores en los estudios realizados con este nuevo tipo de fármacos, muchas son las limitaciones que todavía se tienen en la llamada “terapia dirigida”. La primera limitación es que estos agentes son apenas efectivos en los tipos de tumores

dependientes de las rutas inhibidas por ellos. Además, como muchos tumores son el resultado de la acumulación de numerosas alteraciones genéticas, con inhibir una única ruta de señalización no se tendrán efectos satisfactorios. Visto esto, el diseño de agentes que pueden afectar a varias rutas de señalización podría incrementar los efectos terapéuticos. Sin embargo, con esta aproximación también se incrementa el riesgo de tener toxicidad relacionada con el tratamiento.

Por otro lado, el uso de estos nuevos agentes combinados con la terapia convencional puede también traer nuevas posibilidades a la terapia clínica, siendo igualmente muy importante la búsqueda de moléculas biomarcadoras que puedan predecir la respuesta a la terapia.

No se puede olvidar tampoco que las células cancerígenas desarrollan múltiples mecanismos de resistencia al tratamiento, por lo que la demanda de terapias diseñadas “a la carta”, específicas no únicamente para cada tipo de tumores sino cada tipo de paciente, se incrementa a diario.

Hasta el momento se tienen evidencias de que:

- 1) la inhibición de IGF1R y/o c-kit podrá mejorar los efectos de la terapia convencional, no solo en el SE sino en varios otros tumores (208, 223, 270, 362-373) y
- 2) la inhibición de HSP90 tiene efectos anti-tumorales y su combinación con otros agentes anti-cancerígenos mejora la eficacia del tratamiento, reduciendo el desarrollo de la resistencia al tratamiento (374-379).

Con base a toda esta información, en este proyecto de tesis, pretendemos aclarar distintos puntos sobre el desarrollo y tratamiento de SE. Específicamente proponemos los siguientes objetivos:

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 HIPÓTESIS:

Basándonos en lo expuesto en la introducción, en esta tesis doctoral pretendemos, de una manera general, obtener un mayor grado de conocimiento sobre las bases moleculares, las rutas de señalización de IGF1R y c-kit y los mecanismos de respuesta al tratamiento en Sarcoma de Ewing. Así, proponemos 2 hipótesis:

Hipótesis 1: IGF1R y su ruta de señalización tiene un papel importante en la patogénesis de SE y su inhibición, sola o en combinación con la de c-kit, podrá ser especialmente útil en el tratamiento del SE.

Hipótesis 2: Con el uso de herramientas proteómicas y posteriores estudios moleculares, será posible hallar y validar factores predictivos de la respuesta del SE a fármacos entre los que se cuentan inhibidores de IGF1R.

Para comprobar estas hipótesis, nos proponemos los siguientes objetivos:

2.2 OBJETIVOS:

Correspondientes a la Hipótesis 1:

1. Estudiar la implicación de IGF1R y su ruta de señalización en el Sarcoma de Ewing;
2. Estudiar los efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit en el SE, utilizando inhibidores específicos (ADW742 y/o Imatinib, respectivamente).

Hipótesis y Objetivos

3. Estudiar los efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la terapia convencional del SE, específicamente con Vincristina ó Doxorubicina.
4. Identificar el patrón de expresión proteica en líneas de SE tratadas con ADW742 y/ó Imatinib y su relación con la resistencia de dichas células tumorales al tratamiento con distintos fármacos.
5. Identificar nuevas posibles dianas terapéuticas a partir de los estudios de Proteómica, comprobándolo con estudios moleculares.

Correspondientes a la Hipótesis 2:

6. Realizar estudios funcionales de la(s) proteínas seleccionadas en los estudios proteómicos en SE (objetivo 4);
7. Estudiar los efectos de la combinación de la inhibición de esa(s) proteínas con la de IGF1R ó c-kit en el SE, utilizando inhibidores específicos, tanto a nivel *in vitro* como en modelos animales.

Al conocer con detalle el modo de actuación de estas rutas y los efectos de su inhibición utilizando distintos fármacos específicos, pueden abrirse nuevas líneas de investigación clínica empleando esos mismos inhibidores como adyuvantes a la terapia convencional en casos de pacientes con SE.

3. Materiales y Métodos

3.1 MATERIALES

3.1.1. Líneas celulares

En esta tesis doctoral se han utilizado 5 líneas celulares de Sarcoma de Ewing: A673, TC-71, SK-ES-1, A4573 y TTC466.

La línea A673 se obtuvo de la ECACC (*European Collection of Animal Culture Cells*, #cat. 85111504) y la SK-ES-1 se obtuvo de la ATCC (*American Type Culture Collection*, #cat. HTB-86).

La línea TC-71 fue un regalo de la Dra. Iranzu González, de la Universidad de Navarra y la línea A4573 del Dr. Samuel Navarro, de la Universidad de Valencia.

La línea TCC466 fue un regalo del Dr. Jaume Mora, del Hospital Sant Joan de Déu, de Barcelona.

A continuación se describen las características de cada línea celular.

3.1.1.1.a) Línea A673:

Esta línea celular se obtuvo a partir de un tumor primario de una paciente de 15 años diagnosticada con Rbdomiosarcoma. Presenta morfología epitelial y forma colonias en agar blando y tumores en ratones inmunodeprimidos. Sintetiza y secreta una proteína de ligación a IGF de 34kDa (380) y produce moduladores de crecimiento *in vitro* (381, 382). Aunque inicialmente se haya descrito esta línea celular como de Rbdomiosarcoma, posteriormente se ha descrito como de Sarcoma de Ewing (383, 384) demostrando que posee la fusión EWS-FLI1 de tipo 1.

3.1.1.1b) SK-ES-1:

Esta línea celular se obtuvo a partir de una muestra ósea de un paciente de 18 años de raza caucásica con Sarcoma de Ewing.

Crece en monocapa, con morfología epitelial y tiene la capacidad de formar tumores malignos en ratones inmunodeprimidos.

Esta línea celular presenta la fusión EWS-FLI1 de tipo 2.

3.1.1.1c) TC-71:

La línea TC-71 es una línea que crece en monocapa, con morfología epitelial y tiene la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeprimidos. Posee una fusión EWS-FLI1 de tipo 1(101).

3.1.1.1d) A4573:

Esta línea celular tiene una morfología epitelial y crece en monocapa, aunque en situaciones de mayor confluencia también crezca en pequeños esferoides, formando cultivos tridimensionales. Tiene la fusión EWS-FLI1 de tipo 3 (385).

3.1.1.1.e) TTC466:

La línea celular TTC466 posee la fusión EWS-ERG y crece en monocapa (386).

3.1.1.2. Condiciones de cultivo

Todas las líneas celulares utilizadas se han mantenido en crecimiento en una atmósfera con 5% de CO₂, a 37°C. Se han crecido en placas Falcon de 100mm (#cat. 353003) y para los experimentos de proliferación, apoptosis

y ciclo celular en placas de 12/24 pocillos (#cat. 353043 y #cat. 35304, respectivamente). Para los estudios de movilidad y agar blando se han utilizado placas de 6 pocillos (#cat. 353046).

Todas las líneas se han crecido en medios que contenían 1% de Penicilina/Estreptomina (Invitrogen/Life Technologies, #cat.15140-122) y Suero Bovino Fetal (SBF) (Invitrogen/Life Technologies, #cat.10270.106) que previamente ha sido inactivado por calor a 56°C, durante 30 minutos.

La línea A673 se ha cultivado en medio DMEM (Invitrogen/Life Technologies, #cat. 14167) suplementado con 10% de SBF. La línea SK-ES-1 se ha crecido en medio McCoy's (Invitrogen/Life Technologies, #cat. 26600-023) suplementado con 15% de SBF y la línea TC-71 en medio IMDM (Invitrogen/Life Technologies, #cat. 21980-032) suplementado con 20% de SBF. Las líneas A4573 y TTC466 se han crecido en medio RPMI (Invitrogen, Life Technologies, #cat. 21875-034) suplementadas con 15 y 10% de SBF, respectivamente.

Todas las líneas celulares fueron analizadas para descartar la presencia de Micoplasma, con el kit VenorGeM (Minerva Biolabs, #cat.11-1050).

3.1.1.3. Crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares

Durante el mantenimiento estándar de las líneas celulares, cuando estas llegaban a un estado de confluencia del 70-80% se procedía al pase celular, con el siguiente procedimiento: inicialmente se aspiraba el medio de la placa, se lavaban las células con 5 ml de PBS 1x (KCl 2,68mM (Merk, #cat. 1.04936), KH_2PO_4 1,47mM (Merk, #cat. 1.05099), NaCl 137mM (Merk, #cat. 1.06404) y Na_2HPO_4 7,98mM (Merk, #cat. 1.06579)) y se les añadía tripsina (Invitrogen, Life Technologies, #cat. 25200-056). Tras 3 minutos se

les añadían 5 ml de medio nuevo y se resuspendían bien las células. Dependiendo del estado de las células, se centrifugaban (a 1500rpm, 5min) para eliminar células muertas y otros restos celulares ó directamente se expandían en nuevas placas con medio fresco.

3.1.1.4. Congelación-Descongelación

Cuando se creyó útil, las líneas celulares fueron congeladas. Cuando las células se encontraban en una confluencia superior al 80% se realizó el protocolo similar al de pase celular hasta llegar al punto de la centrifugación y, una vez obtenido el pellet celular, se aspiró el medio, se le añadieron 900-950µl del medio respectivo y se resuspendió nuevamente. Posteriormente se ha transferido ese pellet a criotubos (Corning, #cat. 430659) debidamente rotulados que ya contenían 50-100µl de dimetilsufóxido (DMSO) (Merk Farma y Quimica S.A., # cat. 8029121000) y se pasaron estos tubos a un contenedor “*Mr. Frosty*” que permite una congelación progresiva a -70°C, no menos de 24 horas y posteriormente se guardaron los criotubos en un contenedor de nitrógeno líquido.

Con relación al protocolo de descongelación, el pellet celular se descongeló directamente a 37°C. Cuando el pellet presentó indicios de descongelación (pequeña bola congelada) se trasladó el contenido del criotubo a un tubo Falcon de 50ml que tenía 49ml de medio previamente calentado y se centrifugó a 1500rpm, 5 minutos. Se aspiró el medio, se añadieron otros 25ml de medio y se volvió a centrifugar. Se aspiró de nuevo el medio y se añadieron 10ml de medio fresco. Finalmente estos 10ml de medio se añadieron a una placa de cultivo y se dejaron crecer a 37°C.

3.1. 2. Modelo animal

Para estudiar la capacidad oncogénica de la línea celular A673 y su sensibilidad al tratamiento con inhibidores de HSP90 (la línea que presenta mayor resistencia al tratamiento con los inhibidores de IGF1R y c-kit) se realizaron estudios *in vivo* con ratones inmunodeprimidos. Se llevó a cabo un único estudio para valorar el efecto de la administración individual o combinada de dos fármacos inhibidores de IGF1R y HSP90 (AEW541 y 17AAG, respectivamente). Debido al elevado número de animales que se empleó y para facilitar su manipulación, se realizaron dos tandas de experimentos. Estos ensayos fueron revisados y aceptados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y se realizaron bajo las Normativas Española y de la Unión Europea (RD 1201/05 y 86/609/CEE, respectivamente).

En conjunto, en ambos experimentos se utilizaron 90 ratones jóvenes NOD/SCID (*Non-Obese-Diabetic/Severe-Compromised-ImmunoSystem*) de 4-5 semanas (NOD/CrCrI- Prkdc^{scid} Charles River). La elección de ratones tan jóvenes responde al hecho de tener un modelo más aproximado y real a la edad de aparición del SE en los pacientes.

Para inducir los tumores, se inyectaron subcutáneamente, en el flanco derecho de los ratones, 5×10^6 células en fase de crecimiento exponencial, en una suspensión celular de Matrigel (0,2 ml de células resuspendidas en medio celular 1:1 Matrigel Matrix (BD Bioscience, #cat. 35624), con agujas de 27G (BD Bioscience, # cat. 309310). Los animales estaban anestesiados con IsoFurano (Forane Abbott laboratorios, #cat. B506).

Cuando los tumores empezaron a ser visibles y medibles, los ratones fueron randomizados en grupos control y tratamiento (2-3 semanas tras inyección, día cero de tratamiento) (los ratones sin tumor y aquellos cuyo volumen superó 1 cm^3 no fueron incluidos en el análisis). Los ratones fueron tratados según las pautas de tratamiento específicas de cada fármaco, y se

hizo un seguimiento de la evolución de los tumores y del efecto de los tratamientos durante 2 semanas, valorando diariamente el estado de los animales. Al final del estudio los ratones fueron sacrificados por sobreexposición a Isoflurano y los tumores extraídos para su posterior análisis histopatológico.

Todos estos experimentos se realizaron bajo campana de extracción y en ambiente estéril.

3.1.3. Muestras clínicas

Se estudiaron un total de 62 muestras de biopsias clínicas de Sarcoma de Ewing y 11 de otros tumores (utilizados como controles positivos de fosforilación o negativos de translocación), pertenecientes a 23 hombres y 18 mujeres (32 pacientes sin información), con una media de edades de 26 años en el momento de diagnóstico (18 en el caso de los pacientes de SE). 50% de los casos de SE se localizaban en los miembros inferiores (20.8% en la tibia, 16% en el fémur), 12.5% en los miembros superiores y 21% en la región pélvica, teniendo un 42% de ellos metástasis en los pulmones, hueso y medula en el momento del diagnóstico.

23 muestras eran casos de consulta del Dr. Enrique de Álava y se encontraban incluidas en bloques de parafina y las restantes 50 se obtuvieron mediante colaboración de nuestro laboratorio con el Dr. Christopher Poremba, Heinrich-Heine University, Dusseldorf, Alemania, y se encontraban en dos TMA (*Tissue Microarray*). El uso de este material fue aprobado por los comités éticos de ambas instituciones.

3.1.4. Fármacos

Los fármacos utilizados en esta tesis doctoral son: **3.1.4.1.1) a) inhibidores específicos de IGF1R** (ADW742-ADW y AEW541-AEW); **b) inhibidor de c-kit** (Imatinib-Gleevec-Glivec-IMA) y **c) inhibidor de HSP90** (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycina-17-AAG); **3.1.4.1.2)**

quimioterapéuticos tradicionales: Doxorubicina (DXR) y Vincristina (VCR).

ADW, AEW e IMA han sido amablemente cedidos por Novartis Pharma AG, Basel, Suiza.

La DXR y VCR se han obtenido de Sigma Chemical Co. (#cat. D1515 y Fluka-94898, respectivamente).

El 17-AAG se obtuvo de Alexis Biochemicals, Suiza (#cat. 380-091-M001).

Todos estos fármacos se han resuspendido en DMSO (10mM) (a la excepción de VCR y DXR que se han resuspendido en agua MiliQ) y alícuotado en las concentraciones deseadas.

3.1.4.1a) inhibidores específicos de IGF1R

Para estudiar la inhibición de la ruta de IGF1R se han utilizado dos fármacos desarrollados por la farmacéutica Novartis, el ADW742 y el AEW541. Estos fármacos son inhibidores específicos de la actividad tirosinasa de IGF1R, 16 y 23 veces (respectivamente) más específicos para este receptor que para el de la Insulina. Se ha demostrado que paran el crecimiento tumoral e incrementan el efecto citotóxico de la quimioterapia en casos de cáncer de células pequeñas de pulmón, mieloma múltiple (MM) y tumores sólidos (220, 224, 228, 387).

3.1.4.1b) inhibidor específicos de c-kit

El fármaco utilizado para bloquear la vía de c-kit fue el “famoso” Imatinib, que se ha descrito en detalle en el apartado 1.4.1.1 de la introducción.

3.1.4.1c) inhibidor específicos de HSP90

El 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycina fue el fármaco utilizado para inhibir HSP90.

Se ha demostrado que inhibe la ruta de c-kit en Tumores gastrointestinales (388), inhibe la proliferación de líneas celulares de MM, incrementando la apoptosis y parando el ciclo celular (389) y que inhibe el crecimiento tumoral in vivo de “xenografos” de cáncer de ovario (390).

Actualmente se encuentra en fase 1 y 2 de estudios clínicos y se está probando en pacientes de baja edad con leucemia, tumores sólidos o cáncer de riñón.

3.1.4.1.2) Quimioterapeuticos tradicionales:

La Vincristina es un inhibidor mitótico usado en quimioterapia de cáncer. Se utiliza en varios protocolos de quimioterapia como es el caso del Linfoma de Hodgkin y de la Leucemia Linfoblástica Aguda, entre otros.

Es un alcaloide capaz de unirse a los dímeros de tubulina, inhibiendo su ensamblaje en microtubulos y así se produce una parada de la mitosis, en metafase, afectando a los tipos de células con alto grado de división, como es al caso de las células cancerigenas.

La Doxorubicina es otro fármaco ampliamente utilizado en terapia de cáncer.

Este fármaco es una antraciclina que se intercala en el ADN. Su mecanismo de acción es complejo y no esta totalmente descrito. Se cree que su anillo aromático se intercala entre los pares de bases del ADN y que se une a la topoisomerasa I, estabilizándola e inhibiéndola, impidiendo así que la doble hélice del ADN se reselle y por lo tanto parando la replicación.

3.1.4.2 Tratamiento con fármacos

En esta tesis doctoral, los fármacos se han administrado en las líneas celulares del siguiente modo:

Inicialmente se sembraron las líneas celulares a estudiar en placas de cultivo (de 100mm, 6, 12 ó 24 pocillos, según el tipo de estudio a realizar) y se dejó que alcanzarán una confluencia entre 30-50% (dependiendo del tiempo de tratamiento con los fármacos). En ese momento, y antes de tratar las células con los fármacos, se preparó la batería de medios de cultivo fresco ya con los fármacos en la concentración apropiada para aplicar a cada pocillo (si se tenían placas de 100, 60 ó 35mm, se incubaban directamente los fármacos). Posteriormente se aspiró el medio viejo de las placas y se añadió el nuevo con los fármacos. Se incubaron los fármacos por el tiempo deseado (24, 48 ó 72 horas) y se hicieron los experimentos diseñados.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Medición del Crecimiento Celular por incorporación de MTT

3.2.1.1 Medición

Para determinar los niveles de proliferación celular se realizó el método de la incorporación por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro).

Con este método, al incorporar el MTT (de color amarillo) en el medio de las líneas celulares, este se reduce a formazan (de color morado) en las mitocondrias de las células proliferantes y, añadiendo una solución solubilizante (DMSO), se produce una solución colorada cuya absorbancia se puede medir en un intervalo de longitud de onda entre 500-600nm, determinándose así el nivel de proliferación. Esta reducción se da únicamente cuando las enzimas reductasas de las mitocondrias se encuentran activas, lo que hace que la conversión a formazan sea proporcional al número de células viables.

Así, inicialmente se sembraron 200.000 células por pocillo (resuspendidas en 500 μ l de medio), en placas de 24 pocillos, por duplicado o triplicado para cada condición. Se trataron como se describe en el punto 3.1.4.2 y se dejaron crecer por 24 ó 72 horas. Tras ese tiempo de tratamiento, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se añadió a cada pocillo 300 μ l de una mezcla de 1:10 de MTT (Sigma, #cat. M2128-16, disuelto en PBS1X, a una concentración final de 5 μ g/ μ l, protegido de la luz):medio celular. Se incubaron las placas durante 1hora a 37°C (tapadas con papel de aluminio) y transcurrido ese tiempo se aspiró la mezcla de los pocillos y se añadió DMSO (Merk Farma y Quimica S.A., #cat. 8029121000) (el volumen de DMSO a añadir dependía de lo oscuro que estuviera el pocillo: si estaba muy oscuro se añadió más volumen (1000 μ l) para que se

diluyera la señal y no se saturara y viceversa, si la señal era escasa se añadía menos DMSO (250-500µl). Se agitaron las placas en un agitador, durante 10-15 minutos a la temperatura ambiente (TA) para que se solubilizara bien el formazan. Finalmente se leyó la absorbancia a 570nm, en un medidor de placas (Tecan, UltraEvolution).

3.2.1.2. Análisis isobolográfico

Para estudiar los efectos de la combinación de distintos fármacos, se hicieron múltiples tratamientos de las líneas celulares, con distintas combinaciones de los fármacos (diferentes fármacos por diferentes concentraciones) y se midió la proliferación tras 24 ó 72 de tratamiento.

En base a los datos obtenidos, se analizaron los efectos de las combinaciones aplicando el método isobolográfico de Loewe (391), revisado por Steel y Peckman (392, 393). Según este método, existen tres tipos de interacciones: aditividad, sinergia ó antagonismo. Si se tiene sinergia, se necesita una menor concentración de dA (dosis del fármaco A combinado) y/ó dB (dosis del fármaco B combinado) para obtener los mismos efectos que las dosis teóricas para aditividad y si se tiene antagonismo, se necesita una mayor concentración (394). Para dosis isoeffectivas (que producen el mismo efecto, así como la inhibición del 50% de la proliferación) de dos fármacos combinados (dA + dB) comparados con las dosis de los fármacos solos (DA y DB), las combinaciones cuyo índice de combinación (IC) sea superior a 1 se consideran antagonistas, las que tengan IC igual a 1 son aditivas y las que tengan IC inferior a 1 son sinérgicas. El índice de combinación se calcula según la siguiente formula: $dA/DA + dB/DB$.

En esta tesis doctoral, los índices de combinación para cada situación estudiada fueron calculados considerando los datos del IC₅₀ de proliferación como dosis isoeffectiva. Estos datos se han obtenido ajustando en una

gráfica de Hill los datos de proliferación (usando el programa Origin 6.0). Los respectivos isobogramas se hicieron colocando el IC_{50} de un fármaco en el eje de los xx y el IC_{50} del otro en el eje de los yy. La línea que los unía era la línea que delimitaba la zona de aditividad y los puntos de los IC se podrían encontrar arriba, abajo ó sobre la línea.

3.2.2. *Western Blotting* (WB)

Para estudiar los niveles de expresión de distintas proteínas y sus cambios de fosforilación y/o expresión, se utilizó la técnica de *Western Blotting*. Con esta técnica, se separan en una electroforesis y según su tamaño y carga, las proteínas de un determinado extracto y se transfieren a una membrana donde serán detectadas con anticuerpos específicos para esas proteínas.

Para los estudios de la fosforilación de la cascada de señalización de IGF1R, las líneas celulares fueron mantenidas sin suero toda la noche (ON), pre-tratadas con ADW742 durante 20 minutos y después con el ligando IGF1 durante 15 minutos (R&D Systems, #cat. 291-61). Se estudiaron la expresión/fosforilación de IGF1R, AKT, MAPK y m-TOR. También se estudiaron los niveles de expresión de algunas de las proteínas detectadas en los geles 2D, como es el caso de HSP90, HSP70, GRP75, 14-3-3 y p23.

3.2.2.1. Extracción de proteína

Después de tratar las líneas celulares (en placas de 100 ó 60mm), con los fármacos en cuestión (descrito en el punto 3.1.4.2) se pasó a proceder a la obtención de los extractos proteicos.

Inicialmente se empezó por aspirar el medio de cada placa celular, poniéndolas en hielo (todo el proceso de extracción proteica se debe realizar en hielo para mantener inhibida la actividad de las proteasas y fosfatasa) y haciendo dos lavados con PBS frío (se añadieron entre 5-10ml de PBS frío).

Después se añadieron 500-1000µl de Tampón de Lisis frío (TL) al cual se le habían añadido en el momento los inhibidores de proteasas (IP) (mezcla de Inhibidores de Proteasas 1:25 (en agua MiliQ) de la casa comercial Roche, #cat. 11697498001) y, en el caso de analizar la fosforilación proteica, también los inhibidores de fosfatasa (NaF 50mM (Sigma, #cat. 1504) y Na₃VO₄ 2mM (Sigma, #cat. 450243)). El Tampón de Lisis contenía NP40 1% (Fluka/BioChemika, #cat. 56741), NaCl 150mM, EDTA 50mM (Merck, #cat. 1.08418), Glicerol 10% (Merck #cat. 774794 432) y Tris-HCl 20mM (Merk, #cat. 1.08418). Se dejó que el TL actuara durante algún tiempo (+/-5min) y después se separaron las células mediante raspado, pasando los extractos por pipeteo a tubos eppendorf de 1,5ml y centrifugándolos a 13000g, a 4°C, 15 minutos. Si se pretendía analizar la expresión de una proteína fuertemente anclada a la membrana, para permitir su mejor análisis, antes de centrifugar los extractos, se les pasó por una jeringa con una aguja de 25G. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y se guardaron los extractos a -20°C. En el caso de que se quisiera analizar la fosforilación de una determinada proteína, no se paró la técnica en este punto y se siguió hasta desnaturalizar las muestras. Esto se debe a que con un proceso de congelación/descongelación previo a la desnaturalización se pierde la fosforilación.

3.2.2.2. Cuantificación de Proteínas y Preparación de las Muestras Proteicas

Después de obtener los extractos proteicos se procedió a la determinación de la concentración proteica. En este caso se ha utilizado un kit de determinación de proteína, denominado BCA (Pierce, #cat. 23225).

Inicialmente se prepararon todas las soluciones stock de BSA (Albúmina Bovina Serica)(proteína de referencia, que viene con el kit), con concentraciones conocidas así como 1000µg, 500µg, 250µg y 100µg y el

blanco, diluidas en TL. Se prepararon tubos en duplicado para cada muestra, los cuales tenían las muestras diluidas 1:5 en TL. A todos se les añadió 1 ml del reactivo de trabajo (compuesto por 50:1 del reactivo A: reactivo B del kit) y se les incubó 30 minutos, a 37°C (en el baño). Se dejó que se enfriaran los tubos a la TA y se cogieron entre 800-900µl de cada tubo, pasándolos a placas de 24 pocillos para medir la absorbancia, en un medidor de placas, a 560nm. Con los datos obtenidos, se hizo una curva patrón (retirando el valor del cero a todos los estándares y muestras), determinando la concentración de la proteína.

Según los valores obtenidos y la cantidad de proteína que se quisiera cargar después en el gel de *Western blotting* (entre 40-70mg), se añadieron los µl correspondientes de Tampón de Carga, hirviendo las muestras 5 minutos a 95°C (el Tampón de Carga contenía Tris 200mM (Roche #cat. 70009), DTT 400mM (Sigma #cat. D9779), SDS 8% (Sigma, #cat. L4509), Azul bromofenol 0,05% (Sigma #cat. B-8026), Mercaptoetanol 4% (Sigma #cat. M-3148) y Glicerol 40%.

3.2.2.3. Electroforesis

Después de tener las muestras desnaturalizadas y los cálculos del volumen a cargar hechos, se pasó a hacer la electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-Poliacrilamida.

Inicialmente se montó todo el sistema de electroforesis (los soportes con los cristales adecuados, de 1,5mm y las cubetas de electroforesis) y después se prepararon los geles (el de compactación (4%) y el de carrera (6-10%, dependiendo del tipo de proteína a separar)), a los que se les añadió el Amonio Persulfato (APS) (Sigma, #cat. 248614) y el TEMED (Sigma, #cat. T9281) (agentes polimerizantes) en el momento de colocarlos en el sistema. La composición de los geles es:

Tabla 1: composición de los geles de acrilamida

| Geles (%) | H ₂ O (ml) | Acrilamida* (ml) | Tris-HCl** (ml) | SDS 10% (ml) | TEMED (μl) | APS 10mg/100μl (μl) |
|-----------|-----------------------|------------------|-----------------|--------------|------------|---------------------|
| 4 | 12,68 | 2 | 5 | 0,2 | 20 | 100 |
| 6 | 11,68 | 3 | 5 | 0,2 | 20 | 100 |
| 8 | 10,68 | 4 | 5 | 0,2 | 20 | 100 |
| 10 | 9,68 | 5 | 5 | 0,2 | 20 | 100 |

* Acrilamida/bisacrilamida, 29:1 (Pronadisa, #cat. 8530)

**1.5 M, pH 8.8 (Tris 1,5M y SDS 14mM (a pH 8,8 con HCl)) para el gel de carrera y 0.5M, pH 6.8 para el de compactación (Tris 0,5M y SDS 14mM (a pH=6,8 con HCl))

Se colocó el gel de carrera en el sistema de electroforesis con una pipeta Pasteur y se le añadió inmediatamente isopropanol (Merk Farma y Quimica S.A., #cat. 1.09634.1011) para evitar la aparición de burbujas y mantener la línea del gel recta. Se esperó 30-45 minutos hasta que estuviese polimerizado. Pasado ese tiempo se eliminó el isopropanol (por inversión del sistema) y se añadió el gel de compactación sobre el de carrera, con cuidado para no tener burbujas, y sobre el cual se pusieron los peines adecuados (de 1,5mm con 15-10 pocillos). De nuevo se esperó 30-45 minutos para que polimerizara el gel. Mientras tanto, se preparó el tampón de carrera, también conocido como tampón de carga SDS-PAGE, que contenía Tris 0,025M, glicina 0,2M (Amersham, #cat. 16407) y SDS 0,05%.

Una vez que el gel estaba polimerizado, se colocó en las cubetas de electroforesis (teniendo siempre dos, ó en el caso de tener un solo gel, se coloca en el lado opuesto un "Dam"-plástico que simula cristales con gel, de Biorad) y se lleno la cámara de electroforesis con el Tampón de Carrera. Se cargó el gel con las muestras ya preparadas y con el marcador de pesos

moleculares (Biorad, *Precision Plus Protein Standards All Blue*, #cat. 161-0373). Finamente se corrieron las muestras a 90V hasta que llegaron al gel de carrera, aumentando después el voltaje para 110V.

3.2.2.4. Transferencia

3.2.2.4.1. Preparación de la membrana

Mientras el gel estaba corriendo, se prepararon las membranas para la transferencia. Se cortaron fragmentos de 9x6 cm de membranas de PVDF (Biorad, #cat. 162-0177) y se marcaron con lápiz (para prevenir posibles equívocos). Posteriormente se activaron las membranas, colocándolas en metanol (Merk Farma y Quimica S.A., #cat. 106009.2511) durante 5 segundos y después en agua durante 5 minutos, pasando posteriormente la membrana al Tampón de Transferencia (TT) (Tris 0.25M, Glicina 1.92M y Metanol 20%(Merck, #cat. 1060092511).

3.2.2.4.2. Electrotransferencia

Para la electrotransferencia se empezó por preparar todo el sistema de transferencia, con las cubetas llenas de TT, en hielo. Se humedecieron también los papeles de filtro (cortados con dimensiones ligeramente superiores a las de las membranas) y las esponjas del sistema. Posteriormente, después de terminada la electroforesis, se retiró el gel del sistema de electroforesis y se eliminó el gel de compactación. Se puso el gel de carrera en el TT, recuperándolo con papel de filtro seco y colocándolo en el *cassette* de transferencia, sobre una esponja humedecida. Se preparó el "sándwich de transferencia" con papel de filtro, las esponjas y el gel, sin que quedaran burbujas de aire entre ellos, y de modo a que el gel quedara del lado del polo negativo (cátodo) y la membrana de transferencia del lado del polo positivo (ánodo), ya que las proteínas migran de polo negativo al

positivo (tienen carga negativa). Finalmente se inició la transferencia a 500mA, por 1h20m, a la TA (en un recipiente con hielo) o bien por 14h a 40V en la cámara fría.

3.2.2.5. Immunodetección

3.2.2.5.1. Incubación con los anticuerpos

Una vez finalizada la transferencia, se retiró la membrana del sistema y se lavó con una solución de TBS-T (0,1% Tween20 (Sigma, #cat P7949) en Tris 0,5M, NaCl 1M y KCl 0,05M (Merck, #cat. 1.04936)) por 5 minutos, a la TA. Posteriormente se bloqueó la membrana con 10 ml de solución de bloqueo (TBS-T con 5% BSA (Sigma #cat. A7906-1006)), con agitación ligera, 1 hora a TA.

Trascurrido ese tiempo, se incubó la membrana con 10 ml de la solución del anticuerpo primario (TBS-T 5% de BSA con el anticuerpo a la concentración apropiada), con agitación constante, durante 1-2horas a la TA ó ON, a 4°C.

Posteriormente se lavó la membrana en TBS-T con 0.5% de BSA una vez durante 15 minutos y después 2 veces más (5 minutos). Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (10 ml) en TBS-T 1% BSA, por 30 a 45 minutos. Finalmente se lavó la membrana en TBS-T con 0.5% BSA dos veces durante 15 minutos y después 3 veces más (5 minutos).

Los anticuerpos utilizados han sido: anti-IGF1R β (Santa Cruz Biotech, #cat. sc-713), anti-p-IGF1R (Tyr1135,Tyr1136) (Calbiochem, #cat. 407707), anti-MAPK42/44 (Cell Signalling, #cat.9101), anti-p-MAPK42/44 (Thr202/Tyr204)(Cell Signalling, #cat.9192), anti-AKT (Cell Signalling, #cat.9271), anti-pAKT (Ser473)(Cell Signalling, #cat.9270), anti-mTOR (Cell Signalling, #cat.2971), anti-p-mTOR (Ser2448)(Cell Signalling, #cat.2972), anti-CD117 (Dako, #cat.A4502), anti-HSP90 (Alexis Biochemicals, #cat.ALX-

804-808), anti-GAPDH (Abcam, #cat.ab9385), anti-HSP70 (Cell Signalling, #cat.4872), anti-RhoA (Abcam, #cat.ab23687), anti-GRP75 (Stressgen Bioreagents, #cat.SPS-825), anti-set (Abnova Corp., #cat.6418-M01), anti-EBP1 (Upstate, #cat07-397), anti-14-3-3 (Abcam, #cat.ab6081), anti-p23 (Abcam, #cat.ab26323). Todos estos anticuerpos han sido optimizados de modo a no tener inespecificidad a la hora de la inmunodetección.

3.2.2.5.2. Revelado

Después de incubada con los anticuerpos pretendidos, la membrana fue preparada para el revelado. Se escurrió de la solución de lavado y se puso dentro de una funda de plástico. Se prepararon 2ml de la solución de revelado a razón de 1:1 de solución A y B del kit ECL (Amersham #cat RPN2109) (2 ml para cada membrana pequeña).

Ya en la cámara oscura, se puso la solución de revelado sobre la membrana y se dejó que la reacción de revelado se desarrollara durante 1 minuto. Se colocó la membrana dentro de otra funda de plástico, que estaba dentro del *cassette* de revelado y se colocó sobre la misma la película de revelado. Se dejó revelar desde 15 segundos hasta 15 minutos (dependiendo de los anticuerpos y de la concentración proteica cargada). Se seleccionaron las mejores películas reveladas y se marcaron los pesos moleculares. Las membranas se lavaron dos veces con TBS-T y se guardaron a 4°C, húmedas, para posteriores incubaciones.

3.2.2.6. Densitometría

Después de realizada toda la técnica de *Western Blotting*, para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos, se procedió a un análisis densitométrico, con el programa Quantity One 4.3.1 (Biorad), del aparato GELDoc 2000, en el cual se determinó la cantidad de píxeles que cada

banda contenía, pudiendo comparar y normalizar cada banda con la situación control. De este modo se pudo calcular el porcentaje de cambio de expresión/fosforilación proteica.

3.2.2.7. “Stripping”

En el caso de que se pretendiera incubar la misma membrana con más de un anticuerpo, tras la primera inmunodetección, a la membrana se le hizo un *Stripping*, para eliminar los anticuerpos unidos a ella. Este podría ser más ligero ó más fuerte, dependiendo del tipo y tamaño de proteína a detectar. Así, para el *stripping* más ligero lo que se hizo fue lavar la membrana en 25ml de TBS-T, en agitación, 2 veces durante 5 minutos. Después se lavó la membrana en 30ml SDS 1% durante 20 minutos en agitación intensa y finalmente en 30ml de TBS-T a TA en agitación durante 15 minutos. A partir de aquí se retomo el protocolo de WB, a partir del punto 3.2.2.5.1.

Para el *stripping* más fuerte, se empezó por lavar la membrana con TBS-T en agitación, 2 veces por 5 minutos. Posteriormente se incubó la membrana en la solución de *stripping* (5ml SDS 10%, 1.55 ml Tris-Hcl 0.5M pH 6.7, 18.275ml H₂O y 175µl de 2-mercaptoetanol (Sigma, #cat. M3148) a 65°C, durante 30 minutos, agitando la membrana de 10 en 10 minutos. Por fin se lavó la membrana con TBS-T 2 veces por 10 minutos y a partir de aquí se retomo el protocolo de WB, a partir del punto 3.2.2.5.1.

3.2.3. Inmunoprecipitación (IP)

La técnica de IP es una técnica derivada del WB, en la cual se precipita un antígeno presente en un extracto proteico con un anticuerpo específico para ese antígeno. Este proceso puede ser utilizado para enriquecer una muestra en un determinado antígeno ó, como es el caso de este trabajo,

para identificar proteínas que estén interactuando entre si, llamando a esta técnica de co-IP.

Inicialmente se prepararon los extractos proteicos como se describe en el punto **3.2.2.1. y 3.2.2.2. Cuantificación de Proteínas**. Después, se lavó la proteína agarosa (Santa-Cruz Biotechnology, #cat. sc-2003), la cual, por cada muestra a IP se utilizaron 20 μ l. Los lavados se hicieron 3 veces, con 1ml de tampón de lisis, centrifugando a 13.200 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se resuspendió la agarosa en el tampón de lisis, en el mismo volumen total pipeteado anteriormente. Seguidamente, a los extractos proteicos (entre 0,5-2mg de proteína) se les añadió el volumen correspondiente a 1 μ g de anticuerpo específico para el antígeno a detectar y los 20 μ l de proteína agarosa preparada anteriormente y se completó con tampón de lisis hasta un volumen de 1ml. Se incubaron las muestras a 4°C en un agitador, ON y posteriormente se lavaron con tampón de lisis, 3 veces, centrifugándolas a 13.200 rpm, por pulsos de 13 segundos. Tras el ultimo lavado se resuspendieron las muestras en 30 μ l de tampón de carga y se desnaturalizaron (descrito en el punto **3.2.2.2. Preparación de las muestras proteicas**). A partir de este punto, le técnica se hizo como se describe en WB.

3.2.4. RT-PCR

En esta tesis doctoral se ha pretendido analizar los niveles de expresión de determinados genes de interés como IGF1R. Por ello, se recurrió a la técnica de Retrotranscripción (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con esta técnica, partiendo del Acido Ribonucleico Nuclear (ARN) de una determinada muestra, se retro-transcribe su Acido Desoxiribonucleico Nuclear complementario (cADN), de monocadena,

siguiéndose después una amplificación de ese cADN con oligonucleótidos específicos para los genes en cuestión.

3.2.4.1. RT

3.2.4.1.1. Extracción de ARN total

3.2.4.1.1.1 Tratamiento de las células antes de la extracción

Se empezó por eliminar el medio de cultivo de las placas de cultivo con las células de Ewing y se añadió 1mL de medio RPMI, raspando las células con un *scraper*. Seguidamente se pasó el contenido celular de cada placa a un eppendorf de 2ml y se centrifugaron las muestras a 1200rpm, a TA, durante 5 minutos. Posteriormente se decantó el medio “viejo” y se les añadió nuevo RPMI. Se volvió a centrifugar las muestras en las mismas condiciones, quedando un botón celular en el fondo de los tubos.

3.2.4.1.1.2 Lisis de las células:

A partir de este punto, se trabajaron las muestras bajo campana, para evitar posibles contaminaciones. Se empezó por añadir 1ml de Trizol (Invitrogen, #cat. 15596-018), mezclando bien por pipeteo, incubando las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos nucleóticos. A continuación se añadieron 200µl de cloroformo (Merk Farma y Química S.A., #cat. 8.22265.1000), agitando vigorosamente durante 15 segundos. Se incubaron las muestras a la TA, durante 2-3 minutos y después se centrifugaron a 4°C, a 12.000rpm durante 15 minutos (manteniendo los tubos siempre en hielo a partir de este punto). Tras la centrifugación se forman tres fases, una inferior de color rojo (proteínas), una intermedia blanquecina (ADN), y una superior acuosa (ARN).

3.2.4.1.1.3 Precipitación del ARN:

Se transfirió la fase acuosa con el ARN a un nuevo eppendorf de 1.5ml (poniendo muchísimo cuidado en no tocar la interfase) y se añadieron 500 µl de alcohol isopropílico (Merk Farma y Quimica S.A., #cat. 1.09634.1011). Se mezcló bien y se incubaron las muestras a 4°C durante 10 minutos. Seguidamente se centrifugaron las muestras a 4°C, a 12.000rpm, durante 10 minutos.

3.2.4.1.1.4 Lavado del ARN

Se siguió el protocolo eliminando el sobrenadante y añadiendo 1ml de etanol 75% (Merk Farma y Quimica S.A., #cat.1.00983.2511). Se mezcló bien, mediante vórtex, y se centrifugaron las muestras a 4°C, a 11000rpm, durante 5 minutos.

3.2.4.1.1.5 Redisolver el ARN

Se siguió eliminando el sobrenadante con una pipeta y dejando secar el pellet brevemente con el tubo abierto y en hielo. Se secaron las paredes de los tubos con una pipeta y se resuspendió el ARN en 100µl de agua DEPC (Ambion, #cat. 9922)

3.2.4.1.1.6 Purificación del ARN con el Kit de Quiagen

Para purificar el ARN obtenido se utilizó un kit de columnas específico para el caso, RNeasy Mini kit (Quiagen, #cat. 74104). Se empezó por añadir 350µl de tampón RLT (perteneciente al kit, al que previamente hemos añadido beta-mercaptoetanol (Sigma, #cat. M-3148) a razón de 1ml/10µl beta-ME 14.5M) al ARN extraído, mezclando bien por pipeteo. Se siguió añadiendo 250µl de etanol 100%, se mezcló y se añadió todo el volumen de la mezcla sobre una columna del kit. Se centrifugaron las muestras a

10.000rpm, durante 15 segundos, a TA. Se decantó el líquido sobrenadante (reutilizando el tubo después de cada paso) y se añadieron 350µl de buffer RW1 (perteneciente al kit), centrifugado las muestras a 10.000rpm, durante 15 segundos. Se mezclaron 10µl de DNAsa RNAsa-free (Qiagen, #cat. 79254) con 70µl de buffer RDD (perteneciente al kit) y se añadieron los 80µl sobre las columnas, incubándolas a la TA, 15 minutos. A continuación se añadieron 350µl de buffer RW1 (perteneciente al kit) y se centrifugaron las columnas a 10.000rpm, durante 15 segundos. Se añadieron 500µl de buffer RPE (perteneciente al kit, al que previamente hemos añadido etanol) y se centrifugaron las columnas a 10.000rpm durante 15 segundos. Se añadieron otros 500µl de buffer RPE y se centrifugaron las columnas a 10.000rpm durante 2 minutos. Se pusieron las columnas en nuevos tubos y se centrifugaron a 10.000rpm, durante 1 minuto. Se pusieron las columnas en eppendorfs de 1.5mL y se les añadieron 50µl de agua DEPC, incubando las muestras durante 5 minutos, a TA y centrifugándolas a 10.000rpm, durante 1 minuto, dos veces.

3.2.4.1.1.7. Cuantificación del ARN

Finalmente se leyeron las muestras en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260/280nm.

3.2.4.1.2. Retrotranscripción

Se empezó añadiendo 1µg de ARN (y el resto agua DEPC) hasta un volumen de 10µl, a los cuales se les añadieron 1µl de oligodT (5 µg/µl; 18 nucleótidos de Timina (T); sintetizados por Thermo), mezclando y pipeteando bien, se colocaron las muestras en un termociclador, incubándolas a 70°C, por durante minutos. Mientras tanto, se preparó una solución “*Master Mix*”, que contenía, por cada muestra, 4µl de tampón 5x (5X *First strand buffer*, Invitrogen, #cat. Y00146), 2µl de 0.1M DTT (Invitrogen, #cat. Y00147), 1µl de

10mM DNTP's (Mezcla de Eppendorf, #cat. 0032 003.109), 1µl de Inhibidor de RNAsa (Ambion, #cat. 2684, 10.000 units (40 U/µl)) y 1µl de SSII (*Super Script II reverse transcriptase* (para cADN)) (Invitrogen, #cat. 18064-014, 10.000 unidades). Se sacaron los tubos del termociclador y se les añadieron 9µl de la mezcla a cada uno, todo esto sobre hielo, mezclando bien por pipeteo y luego se les puso en el termociclador, con el siguiente protocolo:

Un paso inicial de anillamiento de 50 minutos a 42°C; y un paso de extensión de 15 minutos a 70°C, con pausa a 10°C por tiempo indefinido.

Finalmente se sacaron los tubos del termociclador y se les añadió a cada tubo 30µl de agua-DEPC para tener un volumen final de 50µl por tubo.

Se han comprobado los resultados de la RT y posibles contaminaciones genómicas realizando una PCR para GAPDH.

3.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.2.4.2.1. Amplificación de cADN

Se empezó por preparar, bajo campana, una Solución Mezcla, la cual contenía, por cada muestra, 2.5µl de Tampón 10X (Promega, #cat. M1906), 0.5µl de DNTP's a 10mM, 2 µl de MgCl₂ 25mM (Promega, #cat. A351B,), 0.4µl de *Primer forward* a 20pmol/µl y 0.4µl de *primer reverse* a 20pmol/µl (comprados a Thermo, con la secuencia específica del gen a amplificar, presentadas en la Tabla 2), 0,25µl de Taq DNA polimerasa (Promega, #cat. M186E, 500unidades 5u/µl) y 16,95µl de agua DEPC. De esta solución se añadieron 23µl a cada tubo que contenía 40ng de nuestro cADN de partida (anteriormente se ha obtenido cADN a la concentración de 20ng/µl), teniéndose un volumen final de 25µl, dando un centrifugado rápido para que los componentes se mezclaran bien. Se colocaran los tubos en un termociclador y se utilizó un programa con el siguiente protocolo:

Un paso inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de anillamiento/extensión de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C y 45

segundos a 72°C, y un paso final de 3 minutos a 72°C. GAPDH se usó como control de referencia.

Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados

| Oligos | Secuencia | Tamaño |
|---------------|-----------------------------|--------|
| IGF1R forward | ACC CGG AGT ACT TCA GCG CT | 230 |
| IGF1R reverso | CAC AGA AGC TTC GTT GAG AA | |
| GAPDH forward | GCT CCT CCT GTT CGA CAG TCA | 101 |
| GAPDH reverse | AAT CCG TTG ACT CCG ACC TTC | |

3.2.4.2.2. Visualización de los productos de PCR

Para visualizar los productos de PCR, las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa (*Agarose D-1 Low EEO*, Pronadisa # cat. 8016) al 1%, diluida en Tampón TAE1X (Tris 2M y EDTA 0,05M) y con 2µg/ml de bromuro de etidio (Pacisa-Giralt, #cat. A1152.0100). Por cada muestra se cargaron 2µl del total de la muestra amplificada, mezclados con 10µl de tampón de carga (*loading dye 6x*, Promega, #cat. 16241006). Como marcador de pesos moleculares se utilizó una escalera de 1000 pbs de Promega (#cat. 65711). Se comenzó la electroforesis y, dependiendo del tipo de muestra, se corrió a un voltaje que varió entre 50-100 mV. La obtención de la fotografía del gel de agarosa se hizo en un Transiluminador de Biorad (GELDoc 2000).

3.2.5. Secuenciación

Con esta técnica es posible determinar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN mediante el método enzimático de los terminadores fluorescentes con un secuenciador automático de capilares. Se ha

Materiales y Métodos

encargado al servicio de Genómica del CIC, para la cual se entregaron 600ng de ADN a secuenciar y los respectivos oligonucleótidos (“primers”) 3.2 pmoles, en un volumen total de 8µl en agua MiliQ.

3.2.5.1. Preparación de la reacción de PCR

Inicialmente se añadieron 3 µl de la solución BigDye (85µl de BigDye Terminador v3.1 (Applied Biosystems, cat. # 4390244) + 65µl de Big Dye Terminador 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems, cat. # 4339843)) a los 8µl de ADN a secuenciar con los oligonucleótidos respectivos y se dio un centrifugado en una centrifuga de placas (Eppendorf, 5804R). Seguidamente se pasaron las muestras a placas de 96 pocillos, se dio de nuevo un centrifugado y se colocaron las placas en un termociclador (Biorad, iCycler) con el siguiente programa: desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C; 25 ciclos de desnaturalización durante 10 segundos a 96°C, anillamiento de los oligos durante 5 segundos a 50°C y elongación durante 4 minutos a 60°C; seguidos de un paso final a 4°C.

3.2.5.2. Precipitación de la reacción de secuenciación

A continuación se añadieron 65 µl de solución de precipitación (etanol 59% (Merck Farma y Quimica S.A., #cat. 1.00983.2511) con acetato sódico 90mM pH 4.6 (Merk, #cat. 1.06267)), se dio un vórtex y se incubó la placa durante 15 minutos a la TA. Posteriormente se centrifugo la placa durante 40 minutos, a 3700rpm, a 6°C, y justo en seguida, con mucho cuidado, se tiro el sobrenadante por inversión de la placa sobre papel, retirando todo lo que fuese posible. A continuación se volvió a centrifugar la placa, pero de esta vez invertida sobre papel, durante 1 minutos a 1000 rpm, a 6°C. En seguida se añadieron 150 µl de etanol 70% frío (-20°C), se dio un vórtex y se centrifugo de nuevo la placa durante 15 minutos a 3700 rpm, a 6°C, tirando el sobrenadante seguidamente de modo análogo al que se hizo

anteriormente y volviendo a centrifugar la placa invertida por 1 minutos a 1000 rpm. Se esperó 10 minutos para que todo el etanol se evaporara y después de comprobar que la placa estaba seca se resuspendieron las muestras en 12µl de Hi-Di formamida (Applied Biosystems, #cat.4311320), dando posteriormente un centrifugado e incubando durante 5 minutos para que se resuspendieran.

3.2.5.3. Preparación del secuenciador

Se empezó por comprobar que había suficiente polímero POP6 (Applied Biosystems, #cat. 4316357) en las jeringas del secuenciador (Applied Biosystems, 3100 Genetic Analyzer) y que no habían burbujas en el circuito, expulsando las que quedaban empujando el embolo de las jeringas. Se llenaron las cubetas de las posiciones 2,3 y 4 con H₂O MiliQ y la de la posición 1 y la que cierra el circuito con Tampón 1x (Applied Biosystems, # cat. 402824). A continuación se colocó la placa en el “*autosampler*” del secuenciador y se metieron los datos de la carrera correspondiente en la colección de datos del secuenciador.

3.2.5.4. Secuenciación y análisis

Con los datos introducidos, se empezó la carrera, durante 2 horas e 30 minutos y después se guardó la placa a 4°C. Se abrió el programa Sequencing Análisis y se han analizado los cromatogramas. Se comprobaron los parámetros de la carrera, verificando que los gráficos siguieran el patrón establecido en el manual del secuenciador y finalmente se estudió la secuencia genómica.

3.2.6. RT-PCR en tiempo real

La técnica de RT-PCR en tiempo real (también llamada RT-PCR cuantitativa) es una técnica basada en la RT-PCR común pero que amplifica y simultáneamente cuantifica el ADN en cuestión. De este modo, se puede detectar y también cuantificar (en números absolutos de número de copias de ADN normalizado respecto a un gen control) de una secuencia específica de ADN (gen), ya que el ADN se va acumulando tras cada ciclo de amplificación.

En esta técnica se empezó por preparar 3 tubos eppendorf de 1.5ml (uno para el agua y los otros dos para la mezcla de primers), 1 eppendorf de 2ml para la mezcla de reactivos, 3 eppendorf de 0.2ml para las diluciones seriadas y los eppendorf de 0.2ml que fuesen necesarios en función al número de tubos de cDNA que tuviésemos. Los eppendorfs de las diluciones seriadas contenían 10, 1 y 0,1 ng de cDNA, mientras que el resto de los cDNAs solamente se diluyeron a 10ng. La mezcla de reactivos contenía

- a) 10.7ml de agua por pocillo.
- b) 0.4ml de primer Fw y 0.4ml de primer Rv por pocillo.
- c) 12.5mL de Q Syber Green Supermix (Biorad, #cat. 170-8882), por pocillo y
- d) 1µl de cDNA por pocillo.

A continuación, se añadieron los 0.8µl de la mezcla de primers en los pocillos correspondientes (placa de 96 pocillos, Biorad, #cat. 2239441) y 23µl de la mezcla de reactivos en todos los pocillos (excepto aquellos que llevaban agua). Posteriormente se añadió 1µl del cDNA problema a los pocillos que correspondían (en los controles negativos no se añadió nada). Finalmente se añadieron 25µl de agua a los pocillos que rodean la placa (y a aquellos posibles pocillos en los que no hubiésemos echado cDNA). Se puso la pegatina que tapa la placa, se dio un centrifugado en una centrifuga para

placas de 96 pocillos y se puso en el termociclador de qRT-PCR. Se seleccionaron los parámetros correspondientes al estudio y la placa en cuestión (95 °C durante 10 minutos, seguidos de 50 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto, 1 ciclo a 95 °C durante 1 minuto, 1 ciclo a 65 °C durante 1 minuto y 60 ciclos finales con una rampa de + 0.5 °C durante 10 segundos, empezando a 65 °C para hacer la “melting curve”), se comprobó la fluorescencia, se seleccionaron los filtros, se hizo una prueba para comprobar si todos los pocillos estaban iluminados de color violeta y se corrió la qRT-PCR.

Todos los primers se diseñaron utilizando el software primer 3 (395).

Tabla 3 : Secuencia de los oligos utilizados en la qRT-PCR

| oligos | Secuencia |
|---------------|--------------------------------|
| Grp75 FW | CCA CCA GGA TAG CTG GAA TG |
| Grp75 RV | CAA CTG CTC CCT TGA TTG CT |
| Grp78 fw | ACC GCT GAG GCT TAT TTG G |
| Grp78 rv | GCG TCT TTG GTT GCT TGG |
| Hsp90 fw | CTG GTG GTG CTG CTG TTT |
| Hsp90 rv | CGA TAG ATG CGG TTG GAG TG |
| Hsp70 fw | ACC ACC ATT CCT ACC AAG CA |
| Hsp70 rv | ACG CTC GCC TTC ATA AAC CT |
| p23 fw | GCA GAA CAA ATC AAG CAC ATC C |
| p23 rv | TCC TCA CGG TAG TCC AAT AGA GC |
| Ebp1 fw | TCC AGA ATC CCA CAG ACC AG |
| Ebp1 rv | TGA CGA GAA CAT CCA CAG CA |
| Set fw | CTG ACC ATT CTG ATG CAG GTG |
| Set rv | CAT CCA TAT CGG GAA CCA AG |
| Tau fw | TGA AGT TGC GTG TGG TGA TG |
| Tau rv | GGA1 TTG GGT GTG TGG GTT G |
| GAPDH fw | GCT CCT CCT GTT CGA CAG TCA |
| GAPDH rv | AAT CCG TTG ACT CCG ACC TTC |

Para el análisis de los resultados, los valores (por triplicado) del *Threshold Cycle* (TC) de los genes en estudio fueron normalizados utilizando las medias del TC de los valores por triplicado de GAPDH, utilizando el modelo matemático de Pfaffl (396).

$$ratio = \frac{(E_{genx})^{\Delta TC_{genx}(control-tratamiento)}}{(E_{GAPDH})^{\Delta TC_{GAPDH}(control-tratamiento)}}; \text{ donde } E \text{ es la eficiencia de la PCR en}$$

tiempo Real, y TC el *Threshold Cycle*.

3.2.7. Estudios de Muerte Celular por Apoptosis

Para los estudios de muerte celular, las líneas de Ewing fueron tratadas con los distintos fármacos de modo análogo a los estudios de proliferación. En este caso se estudió la inducción de apoptosis por Citometría de Flujo.

Con la metodología de citometría de flujo es posible contar, analizar y/o seleccionar componentes específicos de las muestras en estudio, permitiendo el análisis multiparamétrico de las características físicas y/o químicas de una única célula.

Esta técnica se basa en la introducción de las muestras a analizar en un sistema de flujo de líquido isotónico que fluye a través de un sistema óptico de detección de la luz dispersa y emitida por los fluoróforos utilizados en el marcaje de esas mismas muestras. En el caso específico de la inducción de apoptosis, se usó un marcaje doble con AnexinaV-FITC (AV) y Ioduro de Propídeo (IP). Aquí, se pueden distinguir las células viables de las que se encuentran en apoptosis temprana, tardía ó necrosis. Esto se debe a que el IP es un marcador capaz de intercalarse en el DNA celular, marcando así los núcleos de las células en apoptosis tardía y necrosis, ya que en estas células ha ocurrido la ruptura de la membrana plasmática. Sin embargo, este marcador no es capaz de marcar las células en apoptosis temprana, ya que

en estas todavía no se produjo la ruptura de membranas. Aún así se han dado alteraciones a nivel fosfolipídico, en las cuales ocurre la inversión de la fosfatidilserina desde la capa interior hasta la exterior de la bicapa lipídica. De este modo, usando la AV, que se une específicamente a este fosfolípido, se pueden distinguir las células en apoptosis temprana de las viables.

En este estudio se empezó por tratar las líneas celulares con los fármacos e incubar el tiempo seleccionado. Tras ese tiempo se recogió el medio celular para los tubos del citómetro, debidamente rotulados y se tripsinizaron las células con 300µl de tripsina, por 3-5 min. Posteriormente se les añadieron 500µl de PBS y se cogieron las células, pasándolas a los tubos que contenían el sobrenadante, centrifugando las muestras a 1500g, durante 5 minutos. El medio se aspiró, se añadió 1ml de PBS y las muestras de resuspendieron por vórtex. Seguidamente se volvió a centrifugar, en las mismas condiciones ya descritas. Mientras se centrifugaban las muestras, se preparó la solución de trabajo (ST), con AV y PI diluidos en tampón de ligación (por cada muestra la solución final se tenía 2,5µl de AV, 5µl de PI y lo restante de BB hasta 200µl (todos componentes del kit utilizado, el kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection kit* (Immunostep, #cat. Annexinvkit)). Se aspiró el PBS de todos los tubos y se añadieron los 200µl de ST a cada uno de ellos. Se incubaron durante 15 minutos, en la oscuridad y posteriormente se analizaron las muestras en un citómetro FACSsorter utilizando el software Cell-Quest y adquiriendo 20.000 eventos. Finalmente los datos fueron analizados en el software Paint-a-Gate y se hicieron los estudios estadísticos necesarios.

3.2.8. Estudios de Ciclo Celular

En el caso de los estudios de inducción de apoptosis también se usó la técnica citometría de flujo. En este caso se hizo un marcaje único con Ioduro de propídio, que, como se ha descrito anteriormente se intercala en el DNA,

pudiendo así saberse el número de células en cada fase del ciclo celular (para que el PI pueda entrar en las células y marcar el DNA, estas son pre-tratadas con etanol con el fin de permeabilizar la membrana celular sin que esta se rompa).

Así, se empezó por tratar las células con los fármacos e incubar el tiempo seleccionado. Seguidamente se aspiró el medio celular de cada placa, se añadieron 300µl de tripsina a cada pocillo y se dejó actuar de 3 a 5 minutos. Se lavaron las muestras con PBS como en el caso de los estudios de apoptosis y se fijaron con 700µl de etanol 70% (preenfriado a -20°C) (se taparon los tubos de clitómetro con parafilm y se guardaron ON a 4°C). Tras ese periodo de incubación, se lavaron de nuevo las células, 2 veces, como se describió anteriormente (con la diferencia de que aquí se centrifugaron a 1800 rpm). Mientras se centrifugaban las muestras, se preparó la ST que contenía 5µg PI (Sigma, #cat. P4170) y 5µg RNase (Sigma, #cat. 5503) diluidos en 1 ml PBS. A continuación se incubaron las células con 1ml de ST, durante 1 hora, en agitación, a TA y protegidas de la luz (los tubos se taparon y se les dejó en posición horizontal en el agitador para que se mezclaran bien). Finalmente se analizaron las muestras en un citómetro FACSORTER utilizando el software Cell-Quest y adquiriendo 20.000 eventos, a una velocidad de no más de 500-400cél/seg. Por último los datos se analizaron en el software Paint-a-Gate y se hicieron los estudios estadísticos necesarios.

3.2.9. Estudios de Movilidad Celular

Para estudiar la movilidad celular se ha utilizado una metodología “casera” en la cual las líneas celulares se crecieron (en las mismas condiciones descritas en el punto 3.1.1.2.) sobre cubres, hasta la confluencia, y después se “rascó” la mitad del cubre (con un *cutter*) para liberarla de células. Se dejó que las células crecieran durante 72 horas y se han obtenido fotos en los tiempos 0,

24 y 72 horas de tratamiento, en un microscopio Zeiss AxioVert 135. Los datos fueron analizados teniendo en cuenta un rango de crecimiento desde la zona de corte de $< \phi >$ de 5mm.

3.2.10. Estudios de crecimiento celular en agar blando-independiente de anclaje

Para los estudios de agar blando, 1×10^4 células se han crecido en placas de 6 pocillos revestidos con una capa basal de agar 0,6% (Disco, #cat. 214230) (diluido en medio celular). Las células se han mantenido en suspensión en medio con 0,3% de agar además de los fármacos a estudiar. Las colonias que se generaron se han contado a los 14 y 21 días en un microscopio Zeiss AxioVert 135, con un ocular del 10x.

3.2.11. Estudios de ELISA

Con la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* ó Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzimas) hemos pretendido estudiar los efectos de ADW y/o IMA en los niveles de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), utilizando un kit de RD Systems (*Quantikine Human VEGF Immunoassay*, #cat. DVE00). Resumidamente, en esta técnica, se tiene una cantidad determinada de un anticuerpo específico para VEGF pegada a la superficie de la placa. Las muestras en estudio, así como también las muestras control, son incubadas en esos pocillos y el VEGF presente se une al anticuerpo inmovilizado. Tras un par de lavados se les junta un sustrato que va a desarrollar color y así se puede determinar la cantidad de VEGF unido por absorbancia.

Basándonos en lo recomendado por el fabricante, se empezó por añadir 50µl del reactivo RD1W a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Después se les añadieron 200µl de las muestras en estudio y de las muestras control y se incubaron durante 2 horas, a TA. A continuación se aspiró el medio de cada pocillo y se lavó con 400µl de tampón de lavado, 3 veces. Tras el último lavado se secó bien la placa por inversión y con toallitas de papel, se añadió a cada pocillo 200µl del Conjugado VEGF y se incubó durante 2 horas a la TA. Seguidamente se hicieron otros 3 lavados y después se añadieron 200µl de solución de sustrato a cada pocillo bien seco, incubando la placa durante 20 minutos, protegida de la luz. A continuación se añadieron 50µl de solución de parada de reacción a cada pocillo y finalmente se leyó la absorbancia a 450nm, con una corrección de 570nm, en un medidor de placas (Tecan, UltraEvolution).

3.2.12. Estudios de Proteómica

Los estudios de proteómica se hicieron con el objetivo de analizar los cambios generales a nivel de todo el proteoma de determinadas líneas celulares, en condiciones basales o tras tratamiento con ADW ó IMA.

Esta técnica es una ampliación del WB, con la cual se pueden analizar todas las proteínas de un extracto celular. Aquí, se analizan las muestras mediante una electroforesis bidimensional: se separan inicialmente las proteínas en función del punto isoeléctrico (primera dimensión) y en segundo lugar en función del tamaño (segunda dimensión) en geles de poliacrilamida con SDS.

3.2.12.1. Extracción de proteína y cuantificación

3.2.12.1.1 Extracción de proteínas

Inicialmente las líneas celulares se trataron con 0.1 μ M de ADW742 y/o 10 μ M de Imatinib, por 24 y 72 horas, obteniéndose posteriormente los respectivos extractos celulares. Se empezó por aspirar el medio celular de las placas de cultivo, lavándolas 3 veces con 10ml de PBS frío. A continuación se les añadieron 500 μ l de tampón de lisis (descrito en el punto 3.2.2.1.) y se recogieron las células con una asa *Scraper* (sobre hielo), colocándolas en tubos eppendorf individuales. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, 3 veces, añadiéndoles tras la última centrifugación 500 μ l de tampón de lisis 2D, que contenía Urea 7M (Sigma, #cat. U-5378), Thiourea 2M (Sigma, #cat. T7875-500G) y 2% CHAPS (Sigma, #cat. C9426-56) Finalmente, se han sonificado las muestras (Sonic Vibra-Cell), durante 18 segundos, centrifugándolas después 3 veces a 4°C, a 12000rpm.

3.2.12.1.2. Precipitado de las muestras

Este paso se hizo para limpiar las muestras de restos celulares y ADN y obtener únicamente proteínas. Se utilizó un kit comercial, *2D Cleanup Amersham Biosciences kit* (Amersham, #cat. 80-6484-51).

De este modo, se empezó por adicionar tres volúmenes de solución precipitante por cada volumen de muestra, mezclando por vórtex o inversión e incubando a 4-5°C durante 15 minutos. A continuación se adicionaron tres volúmenes de solución co-precipitante por cada volumen de muestra y se mezclaron brevemente por vórtex. Seguidamente se centrifugaron las muestras a 8000g durante 10 minutos y después se decantó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, volviendo a centrifugar las muestras, dando un pulso breve. A continuación se añadió co-precipitante (3-4 veces el tamaño del pellet) y se volvió a centrifugar a 8000g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante

con ayuda de una micropipeta y se añadió agua mili-Q (un volumen suficiente que cubriera bien el pellet), dando un vórtex durante unos segundos. Posteriormente se adicionó 1 ml de “*Wash buffer*” (en frío, -20°C) y $5\mu\text{l}$ de “*wash additive*”, dando un vórtex breve hasta que el pellet se hubiese dispersado completamente, incubando las muestras a -20°C al menos 30 minutos (dando un vórtex de 20-30 segundos cada 10 minutos). Se centrifugaron las muestras posteriormente a 12.000 rpm durante 5 minutos, y por último se les añadieron $200\mu\text{l}$ de tampón lisis 2D.

3.2.12.1.3. Cuantificación de las proteínas

La cuantificación proteica se realizó con un kit comercial, *2-D Quant Amersham Biosciences kit* (Amersham, #cat. 80-6483-56). Se preparó una curva estándar con solución de Albúmina Bovina Sérica (BSA) (que viene con el kit), con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y $50\mu\text{g}$ de proteína.

Posteriormente se preparó el reactivo de color con una parte de *color reagent B* en 100 partes de *color reagent A*, teniendo en cuenta que cada muestra requiere 1 ml. Se añadieron $500\mu\text{l}$ de solución precipitante a cada eppendorf con muestras ó BSA y se incubaron durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionaron $500\mu\text{l}$ de co-precipitante y se mezcló brevemente por vórtex ó inversión. A continuación se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 5 minutos, decantando después el sobrenadante y volviendo a centrifugar durante 1-2 minutos a 10.000 rpm para traer lo que quede de líquido al fondo del tubo. Seguidamente se adicionaron $100\mu\text{l}$ de solución “*cooper*” y $400\mu\text{l}$ de agua mili-Q (dando un vórtex breve para disolver las proteínas) y se les adicionó 1ml de reactivo de color a cada eppendorf, mezclando rápidamente por inversión. Las muestras se incubaron a TA durante 15-20 minutos y tras ese periodo de incubación se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 480nm usando como referencia agua.

3.2.12.2 Electroforesis de Primera Dimensión

3.2.12.2.1 Rehidratación de la muestra

A 100µg de proteína de partida se han añadido 250 µl de solución de rehidratación (8M urea, 0.5% CHAPS, 0.2% DTT, 0.5% tampón IPG (Amersham Biosciences, #cat. 17-6004-40), y 0.002% azul de bromofenol). Posteriormente se colocaron las muestras en los sarcófagos (evitando que quedaran burbujas y que se depositara mucha muestra en los extremos) y se colocaron las tiras de 13cm (pH 3-11) (Amersham, Immobiline Drystrip pH 3-11 NL, 11cm, #cat. 17-6003-74) sobre las muestras, con la parte de gel hacia estas. Seguidamente se añadió un poco de aceite mineral sobre las tiras, para evitar que se secan. Se colocaron los sarcófagos en el aparato de isoelectroenfoque (IPG-PHOR (GE, Barcelona, Spain)), alineados según la longitud y se dejaron las muestras hidratando por, adsorción, como mínimo, por 12 horas.

3.2.12.2.2 Isoelectroenfoque

Después de la hidratación, se comenzó el isoelectroenfoque, con las siguientes condiciones: paso 1: 1 hora a 500V; paso 2: 1 hora a 1000V; paso 3: 1 hora con gradiente de 1000 a 8000V; paso 4: gradiente de 8000 a 50000V; paso 6-final de pausa: 10 horas a 500V. Pasado este tiempo se procedió al equilibrado de las tiras.

3.2.12.3 Electroforesis de Segunda Dimensión

3.2.12.3.1 Carrera de segunda dimensión

En este punto se empezó por montar el sistema de electroforesis y se prepararon los geles de acrilamida (8-16%, dependiendo del tamaño de las proteínas a separar), de 20x20cm (descrito anteriormente para WB). Mientras se polimerizaban los geles, se realizó el equilibrado de las tiras IPG,

para que estuviesen en las condiciones adecuadas para la electroforesis. Se sacaron las tiras de los sarcófagos y se secaron con papel. Se sumergieron en una probeta con H₂O destilada (para eliminar algo de aceite mineral) y se volvieron a secar con papel por la cara del plástico. A continuación se sumergieron las tiras en una cubeta de equilibrado con 4ml del Tampón de Equilibrado (T-EQ) (500mM Tris pH8.8 (Sigma, #cat. T-1503), Urea 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol) con DTT 0,5% (Invitrogen, #cat. Y00147), con la parte del gel hacia arriba y se dejaron en agitación suave durante al menos 15 minutos. Durante este tiempo se preparó T-EQ con 4,5% Iodoacetaminda (IDA) (Amersham, #cat. RPN-6302). Una vez finalizados esos 15 minutos, se añadieron en la cubeta de equilibrado 4ml de T-EQ + IDA y se volvieron a lavar las tiras, sumergiéndolas después en el T-EQ + IDA con la parte del gel hacia arriba, dejándolas agitándose otros 15 minutos. A continuación se sacaron las tiras de la cubeta, se lavaron un par de veces con H₂O fresca y se secaron con un poco de papel. Con ayuda de unas pinzas, se colocaron las tiras en el cristal del gel, con la cara del plástico mirando hacia el cristal mayor y la parte del gel hacia afuera (con una espátula plana las dirigimos hacia abajo hasta que quedaran perfectamente unidas al gel sin formar burbujas). Se añadió la solución selladora de agarosa sobre las tiras (0,5g de agarosa (Sigma, #cat. 8086) con 100ml de tampón Tris 1M y 0,0005% de azul de bromofenol) y se dejó que polimerizara. Se colocaron los cristales dentro de las cubetas de electroforesis y se añadió el tampón de carrera SDS-PAGE en los depósitos superior e inferior de las cubetas. A continuación se corrieron las muestras, a 2V, durante 30 minutos y 17V hasta que el frente de carrera llegara hasta el final del cristal. Por fin se separaron los cristales con una espátula y se depositaron en un recipiente con la solución adecuada del proceso de tinción.

3.2.12.3.2 Tinción de los geles

En este paso hemos realizado una tinción con plata. Para tal, los geles se pusieron en recipientes de tinción con 200ml de una solución de fijación (que contenía 40% etanol y 10% ácido acético (Merk Farma y Química S.A., #cat. 100053.1011) en agua miliQ) y se dejó en agitación suave durante 30 minutos. A continuación se desechó la solución de fijación y se añadieron 200ml de la solución de sensibilización (30% etanol, 0,2% (p/v) tiosulfato sódico (Sigma, #cat. 217263-250G), 6,8% (p/v) acetato sódico (Merk Farma y Química S.A., #cat. 106267.1000) en agua miliQ) dejando los geles en agitación durante 30 minutos más. Seguidamente se desechó la solución de sensibilización y se añadieron 200ml de agua mili-Q, agitando durante 5 minutos (repitiendo este paso 3 veces, durante el cual se preparó la solución de tinción, 0,25% (p/v) de nitrato de plata (Sigma, #cat. S8157-10G) y 400 μ l de formaldehído (Sigma, #cat. F8775), en agua mili-Q). A continuación, se desechó el agua, se añadieron 250ml de la solución de tinción y se dejó en agitación durante 20 minutos. Se eliminó la solución de tinción y se añadieron 200ml de agua mili-Q, dejando en agitación un minuto (se repitió este paso 2 veces). Se desechó el agua mili-Q y se añadieron 250ml de la solución de revelado (2,5% (p/v) carbonato sódico (Merck Farma y Química, #cat.1.06392.0500) y 0,04% formaldehído en agua MiliQ), se mantuvo los geles en agitación de 2 a 5 minutos (en este punto el tiempo no era exacto, se dejó lo necesario para que se revelasen bien las proteínas pero no demasiado para evitar que se quemasen). Seguidamente se eliminó la solución de revelado e inmediatamente se añadieron 200ml de la solución de parada (1,46 % (p/v) EDTA (Merck Farma y Química S.A.; #cat. 1.08418.0250) en agua MiliQ), dejando los geles en agitación durante 10 minutos. A continuación se desechó la solución de parada y se añadieron 200ml de agua mili-Q, se dejaron en agitación durante 5 minutos y se repitió este punto 3 veces. Finalmente se dejaron los geles en agua mili-Q para proceder a escanear (para almacenar los geles después del escaneado se

utilizó una solución de almacenamiento (300 ml de etanol, 46 ml de glicerol y 654 ml de agua mili-Q), en este caso en cantidad suficiente para cubrir los geles).

3.2.12.3.3. Visualización y análisis de los geles

Tras el escaneo y visualización por tinción, se identificaron varios miles de puntos proteicos. Los geles fueron analizados manualmente para determinar cambios cuantitativos de los puntos proteicos entre controles y problemas. Se seleccionaron distintos puntos y se entregaron para su análisis por espectroscopia de masas MALDI-ToF al servicio de proteómica del CIC.

3.2.12.4 Espectroscopia de Masas por MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-Of-Flight):

3.2.12.4.1. Preparación de la Muestra:

3.2.12.4.1.1 Escisión de bandas

Inicialmente se empezó por escindir los puntos elegidos de los geles mediante un sistema robotizado (ProteomeWorks™ Spot Cutter, BioRad).

3.2.12.4.1.2 Digestión de las muestras

A continuación se sometieron los puntos a una degradación proteolítica:

3.2.12.4.1.2.1 Destinción de los puntos

Se empezó por añadir 50µl de Ferrocianuro Potásico 30mM (Merk, #cat. 1.06516) y 50µl de Tiosulfato Sódico 100mM a los puntos, durante aproximadamente 3 minutos, hasta que estos se destiñeran. Se realizaron 2 lavados durante 5 minutos con 100µl de agua MiliQ y después se añadieron

100µl de Acetonitrilo (ACN) (Merk, #cat. 1.00030), durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante a continuación.

3.2.12.4.1.2.2 Reducción/Alquilación:

Se empezó por añadir a las muestras 100µl de TCEP 20mM (Sigma, #cat. C-4706)(en Bicarbonato Amónico 25mM) (BA) (Sigma, #cat. A-6141), incubándolas durante 15 minutos a 37°C, con agitación. Se quitó el sobrenadante, se añadieron 100µl de Iodoacetamida 40mM (Merk, #cat. 8.04744) (en BA 25mM) y se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación. A continuación se realizaron 2 lavados durante 15 minutos, a 37°C y agitación, con 200µl de BA 25mM y después se hizo un lavado mas, durante 15 minutos, a 37°C y agitación, con 200µl de BA 25mM/ ACN 50%. Se secaron las muestras en un secador a vacío (SpeedVac) durante 30 minutos.

3.2.12.4.1.2.3 Digestión:

Seguidamente se diluyó la tripsina (1µg/µl) a 12.5ng/µl con BA 25mM y se añadieron entre 10 y 15µl a las muestras, dejándolas en hielo durante 30-45 minutos. Se eliminó el volumen sobrante y se añadieron 10µl (cubriendo los puntos) de BA 25mM / ACN 9%, incubando a 37°C, entre 12 y 18 horas.

3.2.12.4.1.2.4 Extracción de los péptidos

A continuación se recogió el sobrenadante en un microvial correctamente etiquetado y se hizo un lavado de los fragmentos de gel, cubriéndolos con 25 mM BA/50% ACN, dando un centrifugado rápido. Tras este paso se recogió el sobrenadante en el mismo microvial y se secó en el SpeedVac, resuspendiendo en 5-10µl de Acetonitrilo 50%/ TFA 0.1% (Merk, #cat. 1.08178), sonicando posteriormente las muestras.

3.2.12.4.2. Análisis de la muestra en el Espectrómetro de masas MALDI-TOF

Se empezó por depositar 0,5µl de solución de matriz (DHB/HCCA) (del kit *Starter for Maldi-ToF MS*, Brukel-Dotomics, #cat. 20824) sobre una placa Anchor de Maldi-Tof, y después 1µl del calibrante de péptidos (del kit *Starter for Maldi-ToF MS*) y 1µl de cada una de las muestras, esperando que las muestras y el calibrante de péptidos cristalizaran. Posteriormente se introdujo la placa Anchor en el aparato Maldi-Tof, calibrando el equipo usando el pocillo en el que se han depositado los calibrantes de péptidos, mediante el programa Flex Control. A continuación se obtuvo el patrón peptídico de cada muestra, mediante el programa Flex Control y con el programa X-TOF se hizo una calibración del espectro mediante ajuste cuadrático utilizando para ello 2 picos de tripsina de masa conocida u otros picos conocidos. Se comprobó la calidad de los espectros de cada uno de los picos obtenidos y se eliminaron los de mala calidad. Mediante el programa BIOTOOLS y el motor de búsqueda MASCOT, se buscaron en las bases de datos disponibles la proteína cuyo patrón peptídico correspondía con el patrón peptídico obtenido. Esto se debe a que el conjunto de masas de los péptidos resultantes de la degradación constituyeron una "huella dactilar" de la proteína en análisis. Así, con los datos de m/z de los iones cuasimoleculares (obtenidos en modo lineal), así como con los datos de fragmentación espontánea (PSD, Post-Source Decay; ISD, In-Source Decay) o de iones seleccionados (CID, Collision-Induced Dissociation) se pudo hacer una identificación preliminar de las proteínas cuyos cambios se habían detectado en los geles 2D.

3.2.12.4.3. Análisis de resultados obtenidos

Con los datos obtenidos, se hizo un análisis de interacción de rutas de señalización con las proteínas identificadas, para resaltar las más relevantes

que cambiaron con el tratamiento, usando el Software Ingenuity Pathway Analysis (una aplicación del Software de Ingenuity® Systems, disponible en http://www.ingenuity.com/products/pathways_analysis.html). Con base en estos análisis, se han elegido las proteínas más relevantes, estudiándolas por qRT-PCR y WB.

3.2.13. Inducción de expresión

Para estudiar los efectos de una alta expresión de HSP90 en aquellas líneas celulares cuya expresión era baja, se recurrió a la transfección de un vector de expresión que contenía la secuencia de HSP90 en esas mismas líneas.

La transfección es una técnica por la cual se introduce material genético extraño en células eucariota, usando vectores virales u otros métodos. Esta técnica requiere la apertura de poros momentáneos en la membrana plasmática para que se de la entrada del material genético (Vectores, siRNA, ...), a través de electroporación ó vía liposomal. En el caso de nuestros estudios, se utilizo la electroporación (se incrementa la conductividad eléctrica y permeabilidad de la membrana plasmática aplicando un campo eléctrico a la célula).

3.2.13.1. Obtención del clon de HSP90 en un vector de expresión

El clon de HSP90 se ha obtenido de la biblioteca de clones “*Ultimate ORF Clones*” de la casa comercial Invitrogen (cloneID: IOH61079). Como se tenía que introducir este clon en un vector de expresión específico, el Vector Destino Gateway, se utilizó un kit de Conversión de Vectores Gateway (Invitrogen, #cat. 11828-029) para introducir un “cassete” Rf cassetteA en el vector pCDNA3.1(+) (Invitrogen, #cat. V790-20) y así poder clonar HSP90 usando este vector.

3.2.13.1.1 Conversión del vector pCDNA 3.1 (+) en un Vector de Destino Gateway

Así, y de acuerdo con el fabricante (Invitrogen), se empezó por digerir 5µg del vector pCDNA3.1 (+) con 40U de la enzima EcoRV (Promega, #cat. R6351), durante 6 horas a 37°C (en la reacción de digestión también se tenían 2 µg de BSA (Promega, #cat. R396D)). A continuación se purificó la digestión con el kit de Qiagen *QIAquick PCR Purification kit*, (cat.# 28104), donde se colocó la solución que contenía el vector, las enzimas y todos los tampones de digestión en un sistema de columnas, realizando distintos lavados, recuperando al final el vector resuspendido en tampón TE, pH 8.8 (Tris 10mM y EDTA 1mM). Seguidamente se desfosforilaron los extremos de vector con fosfatasa alcalina (CIAP) (Biolabs, #cat. M0290S), usando 10U e incubando la reacción a 37°C, durante 1 hora. A continuación se inactivó la CIAP a 65°C, durante 15 minutos, volviéndose a purificar los productos de la reacción con el kit de Qiagen y corriendo un gel de agarosa para cuantificar el vector. A continuación se hizo el paso de ligación del vector con el *cassette* del sistema Gateway, el *cassette RfA*. Así, se ligaron 50ng del vector con 10ng del *cassette*, usando 1U de T4 DNA ligasa (Fermentas, #cat. ELO335), a 16°C, O/N. Tras ese período de tiempo se paró la ligación poniendo los tubos a 70°C por 10 minutos.

3.2.13.1.2 Transformación de la reacción de ligación en células competentes

Partiendo de la reacción de ligación del punto anterior, se procedió a hacer una dilución de la misma en tampón TE 1x (Tris 10mM y EDTA 1mM), 5 veces, de la cual se cogió 1µl y se añadió a un vial de células competentes *OneShot ccdB* (incluidas en el kit de Invitrogen), incubándolas en hielo durante 30 minutos. A continuación se hizo el choque térmico poniendo los

tubos a 42°C, durante 30 segundos, volviendo a ponerlos de nuevo en hielo durante otros 2 minutos. Tras ese tiempo se añadió 250µl de médium SOC (viene con el kit) y se incubaron los tubos, horizontalmente, en agitación a 225rpm, a 37°C durante 1 hora. Seguidamente se plaquearon 50 y 100µl de cada ligación en placas de LB agar (Extracto de Levadura 0,5% (Laboratorios Conda, #cat. 1702.05), triptona 1,0% (Laboratorios Conda, #cat. 1612.05), NaCl 1,0% y agar 2% (Laboratorios Conda, #cat. 1800.05)) con 15µg/ml de clorafenicol (Sigma, #cat. C-7795) y 75µg/ml de ampicilina (VWR, #cat. 171254) (para seleccionar específicamente el vector pCDAN3.1(+) con el *cassette RfA*), incubándolas a 37°C, ON. Como control positivo se ha usado el vector pUC19 (viene con el kit). Al día siguiente se han picado 10 colonias de las placas de pCDAN3.1(+) con el *cassette RfA*, creciéndolas ON en 5ml de medio LB con 15µg/ml de clorafenicol.

3.2.13.1.3 Recuperación del DNA plasmídico y Análisis de los transformantes con el DNA plasmídico correcto.

Al día siguiente se aisló el DNA plasmídico con un kit de Macherey-Nagel, *NucleoSpin Plasmid* (#cat. 740588250), con el cual, usando un sistema de columnas, se lava el DNA plasmídico con distintos tampones y donde se recupera ese DNA al final en tampón TE. Seguidamente se hizo un análisis de restricción, usando EcoRI (Fermentas, # cat. ER0271), para comprobar la presencia y orientación correcta del *cassette RfA*. De aquellos plásmidos positivos, se verificó la funcionalidad del gen *ccdB* y la posible resistencia a antibióticos, transformándolos en bacterias competentes DH5α (servicios comunes del CIC, sin #cat.) (como se describió anteriormente en la sección 3.2.13.1.2, para la transformación en células competentes *OneShot ccdB*). De aquellos plásmidos que cumplían todos los requisitos se han cogido 600ng y se han secuenciado para comprobar la correcta inserción del *cassette*. A partir de este punto se empezó la reacción de recombinación

entre el clon de HSP90 y el pCDAN3.1(+) con el *cassette RfA* (al que pasamos a llamar Vector de Destino, VD).

3.2.13.1.4 Reacción de recombinación entre el clon de HSP90 y el VD.

En este punto se empezó por crecer el Clon de HSP90 en placas de LB agar con 50µg/ml de kanamicina (Sigma, #cat. 065K0044), ON a 37°C, picando posteriormente colonias distintas y creciéndolas en medio LB, también ON a 37°C, como ya descrito anteriormente. A continuación se aisló el DNA con el kit de Macherey-Nagel y se utilizaron 150ng para la reacción de recombinación. Para esta recombinación se ha usado el “*Gateway LR Clonase Enzyme mix*” (Invitrogen, # cat. 11791-019). Así, se mezclaron 150ng del clon con 150ng del VD y 2µl de la mezcla referida anteriormente, incubando la reacción a 25°C, ON. A continuación se añadió 1µl de proteinasa k (del *mix*) a cada muestra para terminar la reacción, incubando a 37°C, durante 10 minutos. Posteriormente se pasó a transformar 1µl de la Reacción de Recombinación en 50µl de células competentes DH5α, descrito anteriormente (añadiendo de esta vez 450µl de médium SOC), recuperando al final del proceso el VD con el clon de HSP90 insertado con el kit de Macherey-Nagel. Finalmente se hizo un análisis de restricción para comprobar la inserción del clon, usando 10U de BamHI (Promega, #cat. R6021) y se enviaron a secuenciar los clones positivos para comprobar la inexistencia de mutaciones en el gen.

3.2.13.2. Transfección (Electroporación)

Después de comprobar que realmente se tenía el clon de HSP90 insertado correctamente en el vector pCDNA3.1(+) (VD), se pasó a transfectar las líneas celulares con este DNA, por electroporación. Así, se ha electroporado el VD ó el vector vacío (15 µg) en células A4573, SK-ES-1 y

TC71, analizando posteriormente la proliferación y la inducción de apoptosis (descrito anteriormente).

En este caso se empezó por tripsinizar placas de 100mm confluentes, resuspendiendo los *pellets* celulares en 200µl de medio de cultivo. Estos *pellets* se pasaron a cubetas de electroporación (Biorad, *Bio-Rad 0.4-cm electroporation cuvette*, # cat.165-2088) a las que previamente se habían añadido los 15µg del VD con el clon, 5µl de NaCl 1.5M (Merck Farma y Química S.A., # cat. 1.06404.1000) y 20µg de DNA carrier (esperma de salmón, Sigma, #cat. D7290). A continuación se han electroporado las células, en un Gene Pulser II (Bio-Rad), a 126V/800µF, por 45-50 msec. Se agitaron las cubetas tras el choque y se les añadió 1ml de medio de cultivo, resuspendiendo bien con una micropipeta. Seguidamente se pasó el contenido de las cubetas a tubos falcon, al los cuales se añadió medio celular fresco, plaqueando las células por los pocillos de una placa de 24. Se dejaron crecer las líneas celulares durante 24 horas, se trataron con los fármacos elegidos, se crecieron durante otras 24 ó 72 horas adicionales y finalmente se realizaron los estudios de proliferación y apoptosis.

3.2.14. Interferencia de ARN

Para comprobar los efectos de la inhibición de HSP90 con 17-AAG, se decidió también inhibir HSP90 con siRNA. Los siRNA (*Small interfering RNA*) son 20-25 nucleótidos de ARN de doble cadena que interfieren con la expresión del gen al que corresponden esos nucleótidos, utilizando la propia maquinaria celular. De una manera general la cadena anti-sentido de un siRNA forma parte de un complejo multi-proteico que identifica el mRNA correspondiente, cortándolo en sitios específicos, lo que conlleva a la inducción de degradación y pérdida de la expresión de la proteína codificada por ese gen.

En este caso se ha usado un siRNA para HSP90 ya validado y también un siRNA de control negativo, ambos de Ambion (RefSeq: NM_007355-siRNA ID: 119760 y Cat# AM4611, respectivamente). Se han electroporado células A673 y TTC466 (las que tenían niveles de HSP90 más elevados), como se ha descrito en el punto anterior, usando 75nM del HSP90siRNA. Se dejaron crecer las líneas celulares durante 24 horas y se han tratado con los fármacos elegidos. Se han crecido las líneas celulares durante 24 ó 72 horas adicionales y se han realizado estudios de proliferación y apoptosis para evaluar el efecto de la interferencia del ARN.

3.2.15. Inmunocitoquímica (ICQ)

Con la técnica de ICQ hemos realizado tres tipos de estudios distintos: 1) análisis de la expresión de IGF1R en líneas celulares; 2) análisis de la expresión de HSP90, IGF1R, AKT y m-TOR en tumores de ratones y 3) análisis de la expresión de HSP90, IGF1R, p-IGF1R, AKT, p-AKT, m-TOR, p-m-TOR, c-kit y p-c-kit en muestras clínicas de tumores.

Esta técnica permite identificar los componentes celulares y/o de los tejidos de una determinada muestra, que se encuentra fijada en un porta-objetos, basándose en la detección de determinados antígenos con anticuerpos específicos.

3.2.15.1 Preparación de las muestras

3.2.15.1.1 Líneas celulares

En el caso de las líneas celulares, se emplearon dos métodos diferentes para la obtención de células: obtención de pellet celular en bloques de parafina ó células crecidas sobre porta-objetos.

3.2.15.1.1.1 Pellet celular

Las líneas celulares se sembraron como descrito en el punto 3.1.1.3 y se dejaron llegar a un nivel alto de confluencia (80-90%). Se tripsinizaron y se centrifugaron a 1500rpm, durante 5 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de PBS al pellet celular y se volvió a centrifugar las muestras en las mismas condiciones, dos veces. Tras la última centrifugación se añadieron 10 ml de formaldehído 40% (Surgipath, #cat. 353500600), dejándolo actuar una hora para fijar las células, a la TA. Seguidamente se centrifugaron las células a 3000 rpm, durante 5 minutos y después se decantó el sobrenadante, pasando el pellet celular, con una pipeta de Pasteur, a un trozo de papel de filtro previamente cortado al tamaño adecuado de un casete histológico y mojado en formol. Con una hoja de bisturí se han agrupado las células en el centro del papel y sobre ellas se colocó otro papel humedecido en formol. Se identifico el casete, se montó el *cassette* con dos esponjas humedecidas en formol y se llevó al procesador de tejidos (Thermo Shandon de Excelsior), procesando el pellet con un protocolo de inclusión rápida. Terminado el proceso, se secó el casete y se le introdujo en la parafina (Histoplast, Thermo Shandon, #cat. 06774060) del aparato dispensador (Sakura, Tissue-Teck), realizando el bloque de parafina. Finalmente se realizaron cortes de 2-3 μm en el microtomo (Microm HM 310), fijándolos a los portas-objetos (Menzel, Superfrost Plus, #cat. 631-9483) y guardando las preparaciones a TA.

3.2.15.1.1.2 Células crecidas sobre porta-objetos.

En este caso, las líneas celulares fueron sembradas como descrito en el punto 3.1.1.3, pero poniendo porta-objetos dentro de las placas de cultivo, de manera a que las células crecieran directamente adheridas al porta (los portaobjetos utilizados no necesitaron ningún

tratamiento específico para facilitar la adherencia celular). Posteriormente se fijaron las células con metanol-acetona: se introdujeron los portales en *coplin jar* que contenían PBS frío (4°C), durante 10 minutos y a continuación se pasaron a otros *coplin jar* que contenían metanol (-20°C), durante 10 minutos. Seguidamente se pasaron los portales a *coplin jar* con acetona fría (Merk Farma y Química S.A., #cat. 1.00014)(-20°C), durante 1 minuto y finalmente se quitaron del *coplin jar* y se dejó que se secaran a la TA durante el tiempo necesario.

3.2.15.1.2 Tumores de ratones

En el caso de los tumores de los ratones, en el momento del sacrificio de los animales, los tumores se colocaron directamente en formol y se procesaron lo más rápido posible. Se orientaron las piezas, se colocaron en los moldes histopatológicos, se fijaron en formol y se incluyeron en parafina, como descrito en el punto 3.2.15.1.1.1

3.2.15.1.3 Muestras clínicas

En este caso las muestras clínicas ya se encontraban incluidas en bloques de parafina, habiéndose realizado cortes de 2-3 µm.

3.2.15.2 Inmunodetección

3.2.15.2.1 Desparafinación

Inicialmente se empezó por desparafinar los cortes calentándolos en una estufa a 60°C, ON e introduciéndolos posteriormente en xilol (Panreac, #cat. 141769.16.12), durante 8 minutos, repitiendo este paso 3 veces. A continuación se colocaron los cortes en una solución de xilol/etanol 1:1, durante 5 minutos y seguidamente se empezó la hidratación.

3.2.15.2.2 Hidratación

En este paso se sumergieron las preparaciones sucesivamente en alcoholes de gradación decreciente (100, 96 y 80%) durante 4 minutos cada, sumergiéndolas al final en agua destilada, durante 3 minutos ó más (en el caso de las células crecidas sobre portas estos dos puntos no han sido necesarios).

3.2.15.2.3 Desenmascaramiento

Dependiendo de la proteína que se quisiera visualizar, se han utilizados diferentes tipos de desenmascaramiento:

3.2.15.2.3.1 Tratamiento con calor y químico

3.2.15.2.3.1.1 Microondas

El desenmascaramiento por calor usando el microondas se hizo en el caso de la detección de la expresión de IGF1R, sumergiendo las muestras en tampón citrato pH 6 (Ventana, #cat. 760-107), irradiándolas en el microondas durante 10 minutos.

3.2.15.2.3.1.2 Baño

Para los demás anticuerpos, se ha utilizado el aparato Discovery (Ventana), que tiene estos pasos automatizados, en el cual se incubaron las preparaciones durante 56 minutos, entre 95 °C-100°C. En el caso de los anticuerpos para detectar HSP90, AKT, m-TOR, p-m-TOR y c-kit se utilizó el tampón Tris-EDTA pH 8 (Ventana, #cat. 950-124) y para los anticuerpos para detectar p-IGF1R y p-AKT se utilizó el tampón citrato pH 6.

3.2.15.2.3.2 Tratamiento químico y bloqueo inespecífico de proteínas

Posteriormente, se hizo el bloqueo inespecífico de las proteínas de las preparaciones referidas en el punto anterior (las tratadas con el sistema Discovery, para detectar todas las proteínas a la excepción de IGF1R) con un kit propio del sistema Discovery, el Kit Omnimap (Ventana, #cat. 760-159).

En el caso de la detección de IGF1R, no se ha requerido bloqueo, ya que la solución del diluyente del anticuerpo primario (DAKO Antibody Diluent, #cat. S2022) sirvió de bloqueante.

3.2.15.2.4. Inhibición de la peroxidasa endógena.

Este paso únicamente se realizó para la detección de IGF1R, en el cual se incubaron las preparaciones con H₂O₂ (Dako, #cat. S2001), durante 10 minutos.

3.2.15.2.5. Incubación con el anticuerpo primario

Tras el desenmascaramiento se pasó a incubar las preparaciones con el anticuerpo primario específico, diluido en la solución diluyente correspondiente cada aparato (en el caso del Discovery fue la solución del Kit Omnimap (Ventana, #cat. 760-159) y en el caso del Autostainer fue DAKO Antibody Diluent (Dako, #cat. S2022), durante 1 hora, a 37°C, haciendo posteriormente tres lavados con PBS1 x, durante 5 minutos (en la Tabla 4 se recoge la información referente a los anticuerpos utilizados).

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados en ICQ

| anticuerpos | dilución | Tipo anticuerpo | Casa comer. | referencia |
|-------------|----------|--------------------|-----------------|------------|
| HSP90 | 2g/ml | Monoc. (clon E296) | Abcam | ab32568 |
| IGF1R | 1/50 | Policlonal | Cell Signalling | #3022 |
| p-IGF1R | 1/75 | Policlonal | Cell Signalling | #3021 |
| AKT | 1/500 | Policlonal | Cell Signalling | #9272 |
| p-AKT | 1/25 | Policlonal | Cell Signalling | #9271 |
| m-TOR | 1/50 | Policlonal | Cell Signalling | #2972 |
| p-m-TOR | 1/50 | Policlonal | Cell Signalling | #2971 |
| c-kit | 1/200 | Policlonal | Dako | A4502 |
| p-c-kit | 1/50 | Policlonal | Cell Signalling | #3391 |

3.2.15.2.6. Incubación con el anticuerpo secundario

A continuación se incubaron las preparaciones con el anticuerpo secundario (conejo-HRP (Ventana, #cat. 760-4311) ó ratón-HRP (Ventana, #cat. 760-4310), diluyéndolos en la misma solución que los anticuerpos primarios, durante 30-40 minutos y posteriormente se lavaron las muestras con PBS, 3 veces, durante 5 minutos.

3.2.15.2.7 Revelado

En el caso de la detección para IGF1R, se utilizó el método de visualización Envisión-DAB y en el de los demás anticuerpos el de Omnimap.

3.2.15.2.8. Deshidratación

Una vez terminada la reacción de revelado las muestras se sumergieron en una batería de soluciones de etanol de gradación creciente (80, 96 y 100%) y xilol (etanol 100% 1:1 y xilol 100%), durante 4 minutos en las soluciones de etanol y 5 minutos en las de xilol, repitiendo el ultimo paso dos veces más.

3.2.15.2.9. Montaje de las preparaciones

Finalmente se montaron las preparaciones con DEPEX (Merck #cat.1.01979.0500) y se guardaron para posterior análisis al microscopio.

3.2.16. Estudios del crecimiento tumoral *in vivo*

Como se ha descrito anteriormente en el punto 3.1.2, se ha estudiado la capacidad oncogénica de la línea celular A673 y su sensibilidad al tratamiento con inhibidores de HSP90 y IGF1R *in vivo* con ratones inmunodeprimidos, NOD/SCID.

Los ratones fueron tratados durante 2 semanas y se establecieron las siguientes pautas de tratamiento:

Grupo 1 (Control): ácido D-tartárico 25mM (Sigma-Aldrich, #cat. T20-6) (vehículo 1), por vía oral (con cánulas rectas de 25G (Cibertec, #cat. BS4 52-4041), dos veces por día, 7 días a la semana.

Grupo 2 (Control): PBS con Tween 80 (Sigma-Aldrich, #cat. 27436-4) al 0.05% y DMSO (al 10%) (vehículo 2), por vía intraperitoneal con agujas de 30G (BD Biosciences, #cat. 320468), dos veces por día, 5 días a la semana.

Grupo 3 (Control): vehículo 1 siguiendo la pauta del grupo 1 + vehículo 2 siguiendo la pauta del grupo 2.

Grupo 4 (AEW541): 100mg/kg/día en la primera semana y 50mg/kg/día en la segunda (resuspendido en vehículo 1), por vía oral, dos veces por día, 7 días a la semana.

Grupo 5 (AEW541): 50mg/kg/día (resuspendido en vehículo 1), por vía oral, dos veces por día, 7 días a la semana.

Grupo 6 (17-AAG): 80mg/kg/día (resuspendido en vehículo 2), por vía intraperitoneal, dos veces por día, 5 días a la semana,

Grupo 7 (AEW541 + 17AAG): AEW541 con la misma pauta que el grupo 4. 17-AAG con la misma pauta que el grupo 6.

Grupo 8: (AEW541 + 17AAG): AEW541 con la misma pauta que el grupo 5. 17-AAG con la misma pauta que el grupo 5.

Se hizo un seguimiento de la evolución de los tumores y el efecto de los tratamientos, valorando diariamente el estado de los animales. Los tumores fueron medidos cada dos-tres días con un calibre, y los diámetros anotados. Los volúmenes tumorales fueron calculados según la siguiente fórmula: $\left(a^2 b \pi / 6\right)$, donde a es el diámetro mas pequeño y b el más grande.

Al final del estudio los ratones fueron sacrificados por sobreexposición a Isoflorano y los tumores extraídos para su posterior análisis histopatológico.

3.2.17. Tratamiento Estadístico

Para estudiar la significación estadística de todos los resultados obtenidos, se hizo un análisis *ANOVA One-Way* de la Variancia para Muestras Independientes, usando el sitio web *VassarStats for Statistical Computation*.

El Laboratorio de Patología Molecular de Sarcomas y otros Tumores ha obtenido, con fecha 30 de marzo de 2007, la certificación de la Norma ISO9001:2000, habiendo pasado con distinción el primer control anual a fecha de 9 de abril de 2008, por tanto todos los Protocolos de Trabajo (PNTs) descritos anteriormente están así mismo certificados.

4. Resultados

4.1 Estudio de la implicación de IGF1R y su ruta de señalización en Sarcoma de Ewing

4.1.1 Expresión de IGF1R

Antes de estudiar la implicación de IGF1R y su inhibición en SE, se empezó por caracterizar sus niveles de expresión y activación en 4 líneas de SE con diferentes tipos de fusión EWS-Fli1: A673, TC71, SK-ES-1 y A4573. Como se puede apreciar en la Figura 11, se obtuvo una expresión constitutiva y consistente en todas las líneas celulares, tanto a nivel del ARNm como de proteína (Figura 11A y B, respectivamente), con reactividad en la membrana plasmática (Figura 11C). La línea A673 fue la que presentó menor expresión de IGF1R y casi activación basal nula para p-IGF1R; las líneas A4573 y TC-71 presentaron los mayores niveles de fosforilación de este receptor.

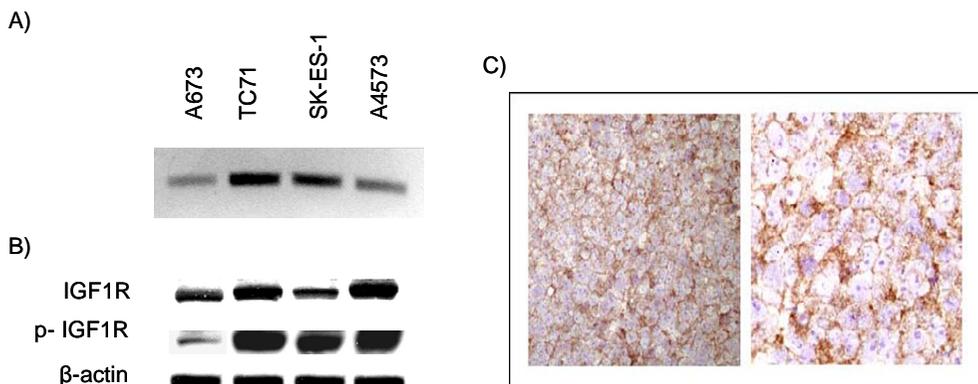


Figura 11: Expresión de IGF1R en líneas celulares de SE. A) En los estudios de RT-PCR se detectó una banda de 230pb, correspondiente al ARNm de IGF1R; B) Con los estudios de *Western Blotting* se detectó una banda de 95kDa, siendo la activación de IGF1R menor en la línea A673; C) Los estudios de ICQ pusieron de manifiesto la presencia de IGF1R en la membrana plasmática.

4.1.2 Efectos de ADW742 en la ruta de señalización de IGF1R

A continuación se caracterizó por *Western Blotting* la activación de la ruta de señalización de IGF1R y posteriormente los efectos del tratamiento con ADW742 en este circuito.

Se empezó por realizar un estudio preliminar para optimizar las condiciones de tratamiento con IGF1 y ADW742. De ese modo, se eligió un pre-tratamiento con ADW742, durante 20 minutos, con un rango de concentraciones entre 0,25-15 μ M y un tratamiento durante 15 minutos con IGF1, con una concentración de 50ng/ml. Seguidamente se realizaron los estudios de caracterización de activación de la ruta de señalización.

En estas condiciones se observó que todas las líneas celulares eran capaces de responder al estímulo de IGF1, con el cual se indujo la fosforilación no tan solo de IGF1R pero también de AKT, una proteína que se encuentra “por debajo de IGF1R” en su ruta de señalización, lo que demuestra que esta ruta está activa (Figura 12, 2 primeras bandas de los blots presentados).

Con el tratamiento con ADW742 se obtuvo un bloqueo dosis-dependiente de la activación basal e IGF1-inducida en todas las líneas celulares estudiadas, con IC₅₀ de fosforilación entre 0,171-0,508 μ M (Tabla 5), siendo la línea A673 la más insensible al tratamiento. De este modo se demostró que ADW742 realmente inhibía la actividad cinasa de IGF1R, justificando que era un buen fármaco para testar en líneas de SE. Además, la activación de la ruta de AKT inducida por IGF1 fue marcadamente inhibida con el pre-tratamiento con ADW, obteniéndose también una inhibición de p-AKT y p-m-TOR dosis-dependiente. La sensibilidad a este fármaco demostró una correlación positiva con los niveles de expresión y activación basal de IGF1R. Por otro lado, MAPK42/44 siguió activa, incluso cuando en el pre-tratamiento se utilizaron concentraciones altas (a la excepción de A4573).

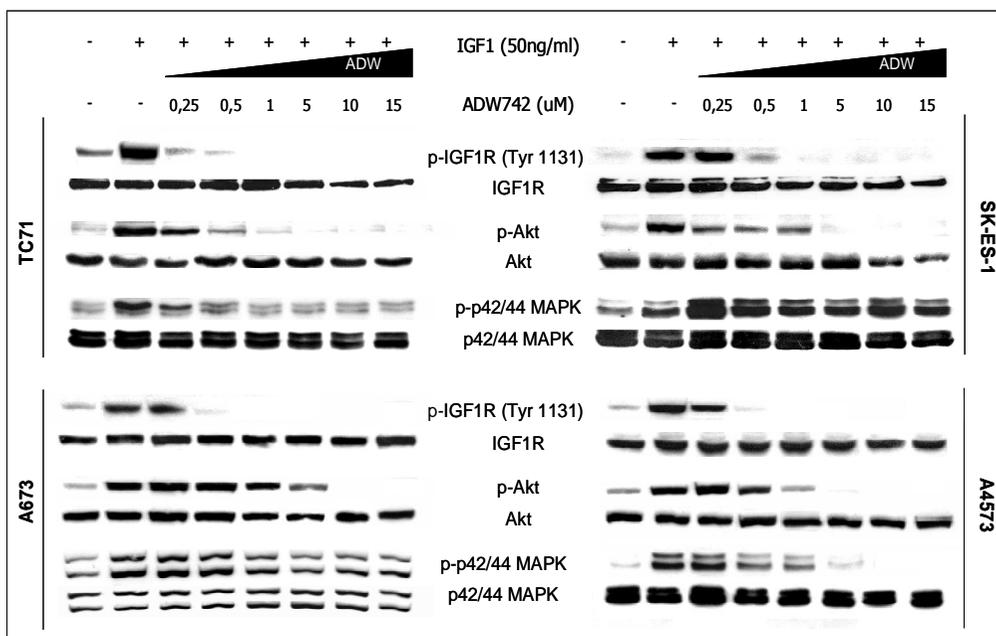


Figura 12: Efectos del tratamiento con ADW742 en la activación de la ruta de IGF1R. En todas las líneas celulares se observó activación basal e IGF1-inducida de la ruta de IGF1R. Tras tratamiento con ADW se obtuvo una disminución de la fosforilación de IGF1R y AKT, completamente bloqueado con 5µM de ADW.

Resultados

Tabla 5: IC₅₀ de fosforilación de IGF1R, AKT, MAPK y mTOR tras tratamiento con ADW742.

| | | Línea celular | | | |
|---------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| fármaco | proteína | A673 | TC-71 | SK-ES-1 | A4573 |
| ADW | p-IGF1R | 0,508 +/- 0,120 | 0,244 +/- 0,098 | 0,184 +/- 0,154 | 0,171 +/- 0,053 |
| | p-AKT | 1 +/- 0,54 | 0,290 +/- 0,06 | 0,350 +/- 0,013 | 0,810 +/- 0,028 |
| | p-MAPK | >5 | >5 | 3 +/- 2,83 | 2,08 +/- 0,35 |
| | p-m-TOR | 0,51 +/- 0,023 | 0,308 +/- 0,045 | 0,24 +/- 0,018 | 0,41 +/- 0,098 |

4.1.3 Efectos de ADW742 en la proliferación, apoptosis y ciclo celular de las líneas de SE.

Para determinar cuales eran los efectos de la inhibición de la ruta de IGF1R en las líneas celulares de SE, posteriormente se estudiaron los efectos del tratamiento con ADW742, a las 24 y 72 horas de tratamiento, en la proliferación, apoptosis y ciclo celular de las líneas de SE.

4.1.3.1 Efectos de ADW742 en la proliferación de las líneas celulares de SE.

Se realizó un estudio dosis-respuesta para seleccionar el rango de concentraciones capaces de inhibir efectivamente la proliferación celular, que se utilizarían posteriormente para los demás estudios.

Como se puede apreciar en la Figura 13 y en la Tabla 6, se obtuvo una fuerte inhibición de la proliferación tras tratamiento con ADW, de una manera dosis-dependiente, con ambos tiempos de incubación. Todas las líneas celulares han presentado IC_{50} de proliferación idénticos (calculados mediante un ajuste no lineal, con aproximación a la función sigmoideal de Hill), a la excepción de A673 a las 72 horas de tratamiento, la línea que tenía menor activación basal de IGF1R. Se verificó una disminución de la razón de 10x del IC_{50} a las 72 horas en comparación con el de las 24 horas, siendo de este modo la concentración aplicada en los estudios a las 72 horas fue bastante menor y así los resultados obtenidos debidos únicamente a la inhibición de IGF1R y no a otros efectos inespecíficos.

Tabla 6: IC_{50} de proliferación (μM) de las líneas celulares tratadas con ADW742, a las 24 y 72 horas de tratamiento.

| Líneas celulares | 24 horas | 72 horas |
|------------------|---------------|---------------|
| A673 | 5,20 +/- 0,67 | 1,41 +/- 0,28 |
| TC-71 | 5,03 +/- 0,74 | 0,67 +/- 0,08 |
| SK-ES-1 | 5,11 +/- 0,71 | 0,55 +/- 0,05 |
| A4573 | 4,30 +/- 0,63 | 0,64 +/- 0,06 |

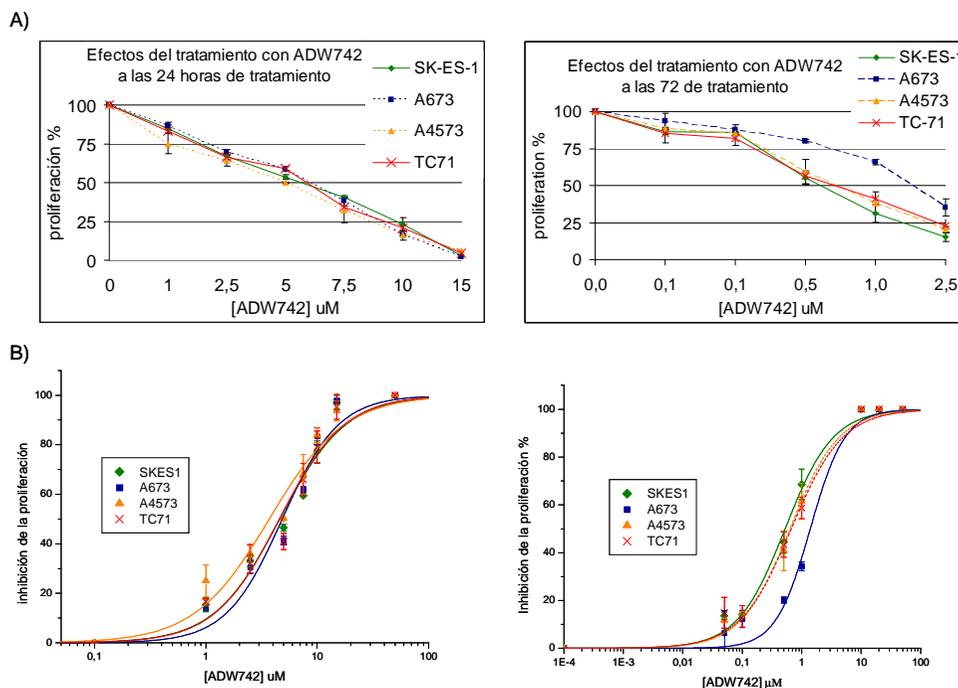


Figura 13: Efectos anti-proliferativos de ADW742 en las 4 líneas celulares de SE. A) Representación gráfica de la inhibición del crecimiento celular. Todas las líneas celulares han tenido una respuesta similar, dosis-dependiente. B) Cálculo del IC_{50} de proliferación a las 24 y 72 horas de tratamiento, según un ajuste no lineal sigmoidal de Hill. Se han obtenido valores de aproximadamente 5 y $0,6\mu M$, respectivamente a las 24 y 72 de tratamiento.

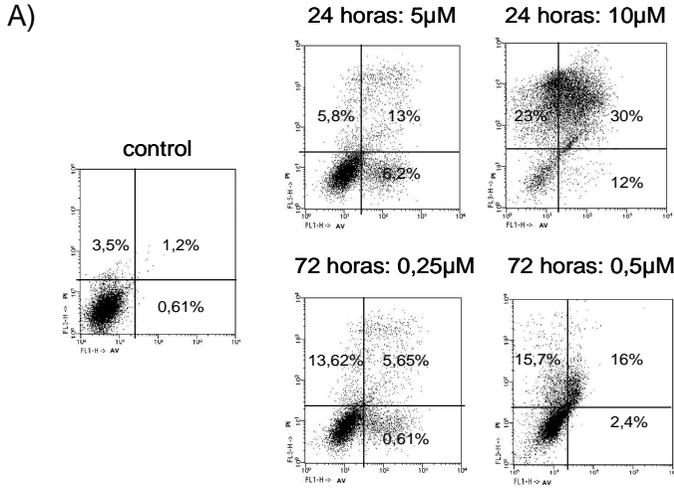
4.1.3.2. Efectos de ADW742 en la apoptosis y ciclo celular

Para determinar la causa del descenso de proliferación inducido por tratamiento con ADW, se estudió la inducción de apoptosis y la parada de ciclo celular de las líneas de SE tratadas con ADW.

Como se puede apreciar en la Figura 14, usando un rango de concentraciones cercano al IC_{50} de proliferación, se obtuvo una inducción de la apoptosis del 20-30% en todas las líneas celulares. Sin embargo, los niveles de la disminución de proliferación no coincidían exactamente con los de la inducción de apoptosis, por lo que se comprobó a continuación si la

Resultados

proliferación también se estaba disminuyendo debido a una parada del ciclo celular.



B)

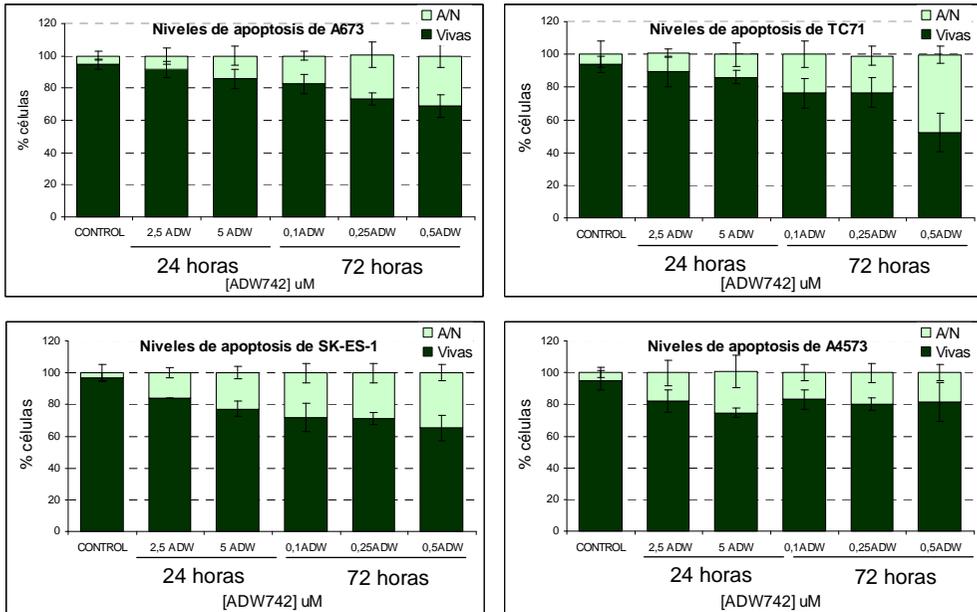


Figura 14: Efectos del tratamiento con ADW742 en los niveles de apoptosis de las líneas de SE. A) Imágenes de los histogramas de algunas condiciones del tratamiento de la línea A4573. B) Representación grafica de todas las condiciones del tratamiento con ADW. La inducción de apoptosis no coincide exactamente con los niveles de inhibición de proliferación.

Se verificó que el principal efecto de este fármaco a nivel del ciclo celular fue una disminución del número de células en la fase S, con parada en la fase G1, siendo más efectivo en las líneas A4573 y SK-ES-1, en ambos tiempos de tratamiento. Estos resultados sugieren que ADW estaba inhibiendo la proliferación celular no solamente induciendo la apoptosis si no también como citostático, interfiriendo con la progresión del ciclo celular.

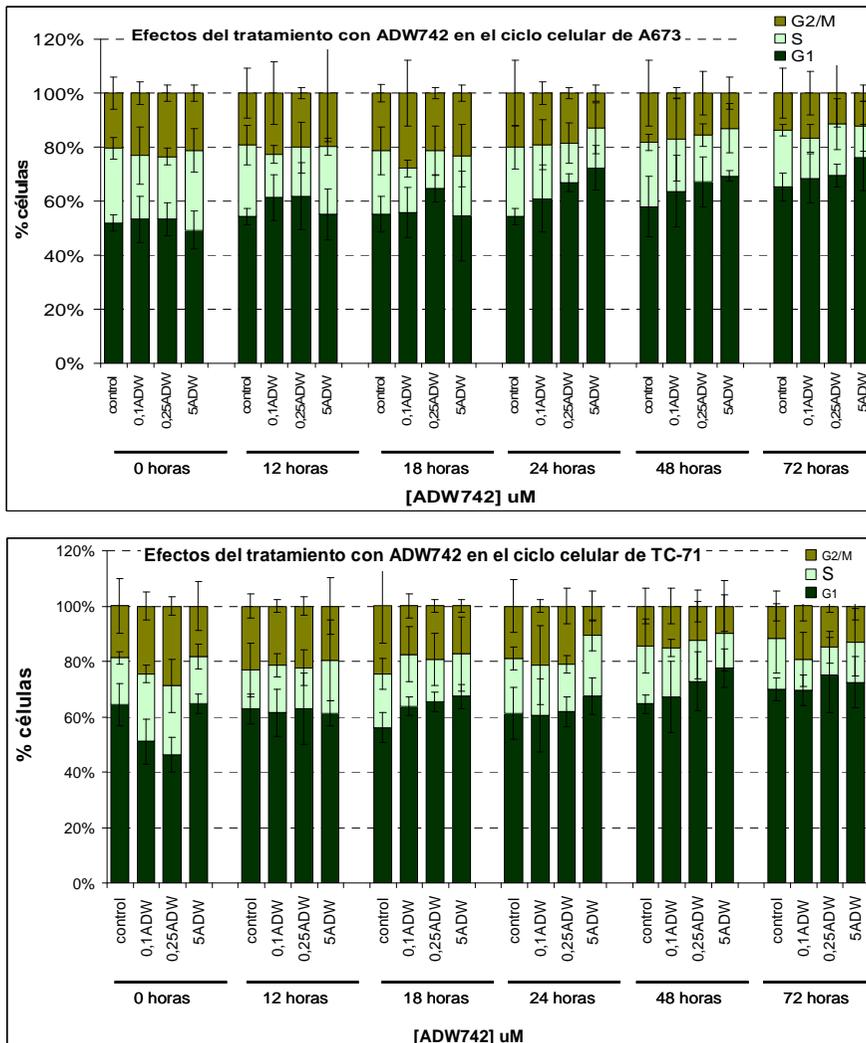


Figura 15: Efectos del tratamiento con ADW742 en la progresión del ciclo celular de las líneas A673 y TC71. Representación gráfica de todas las condiciones de tratamiento. ADW indujo una disminución del número de células en la fase S, con una parada del ciclo celular en la fase G1.

Resultados

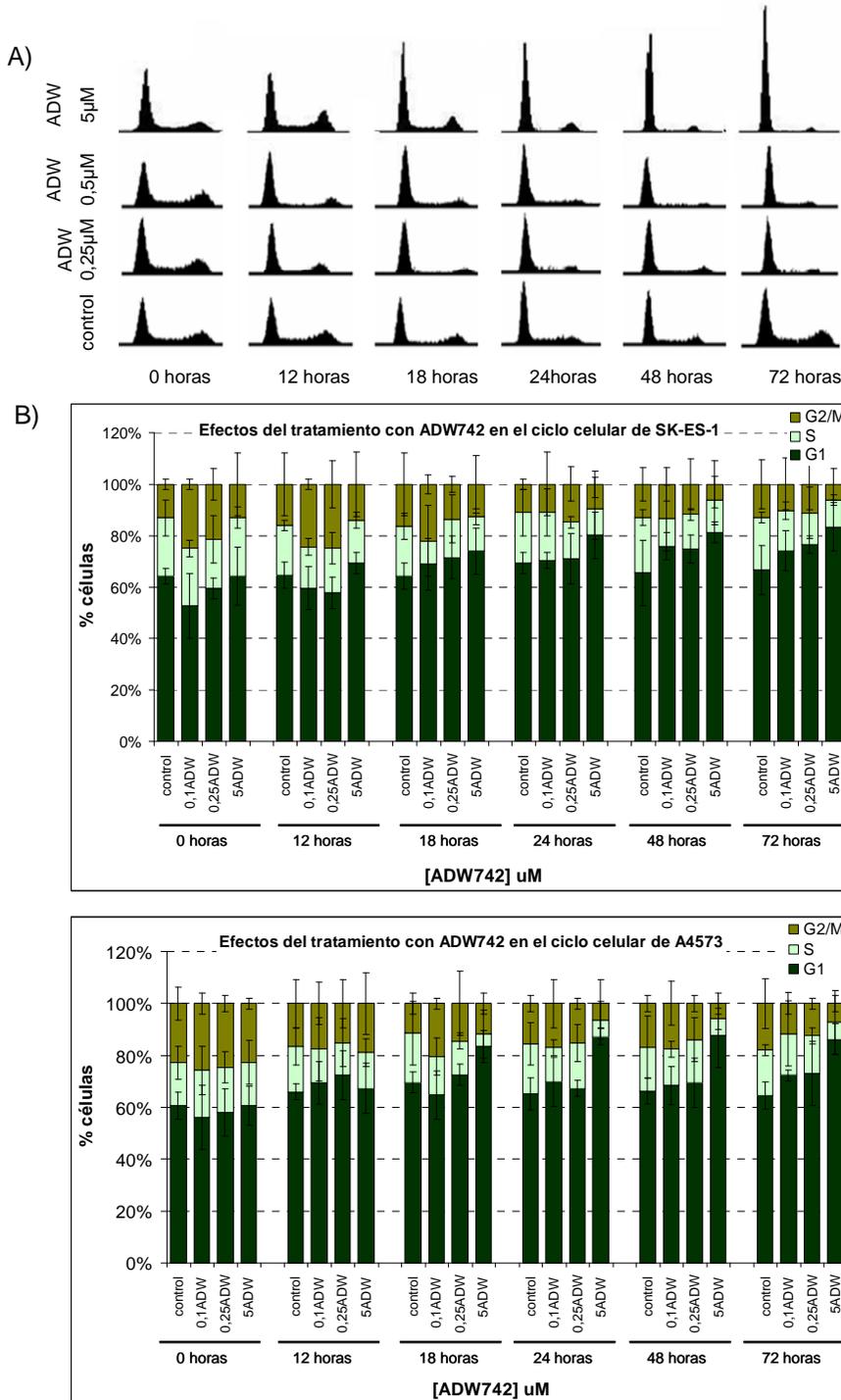


Figura 16: Efectos del tratamiento con ADW742 en la progresión del ciclo celular de las líneas SK-ES-1 y A4573. A) Imágenes de los histogramas de algunas condiciones del tratamiento de la línea A4573. B) Representación gráfica de todas las condiciones de tratamiento. ADW indujo una disminución del número de células en la fase S, con una parada del ciclo celular en la fase G1.

4.2 Estudio de los efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit.

Dado que la ruta de c-kit es otra ruta que se encuentra de-regulada en SE y que se había demostrado previamente que Imatinib inhibía eficazmente esta ruta (155), se decidió comprobar los efectos de combinar la inhibición de IGF1R con la de c-kit en nuestras líneas de SE, como una nueva posible aproximación a la terapia de SE.

4.2.1 Efectos de la combinación de ADW+IMA en la ruta de señalización de IGF1R.

El principal impacto de combinar ADW con IMA en la ruta de señalización de IGF1R fue la disminución de la fosforilación de AKT y mTOR, obteniéndose una elevada reducción del IC_{50} de fosforilación de ambas proteínas (Figura 17, Figura 18, Figura 19 y Tabla 7), obteniéndose una reducción de 2x en el caso de p-AKT y de 3x en el de p-m-TOR. Respecto a la fosforilación de MAPK42/44, una vez más, no se han detectado cambios significativos.

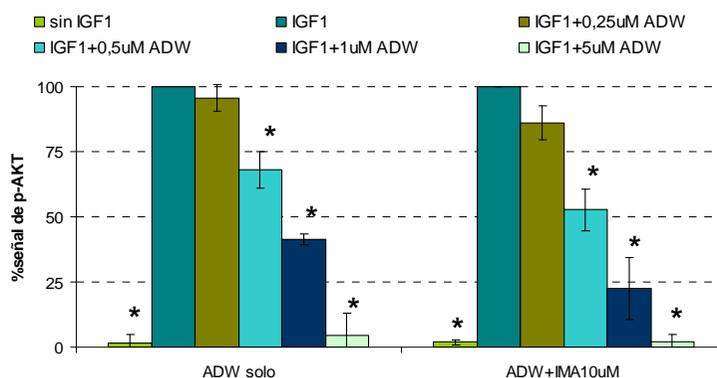
Aunque se hubiese descrito anteriormente que IMA sólo no era capaz de inhibir la fosforilación de AKT (155), en este caso al combinarlo con ADW, se obtuvo una disminución de los niveles de p-AKT y p-mTOR, de una manera sinérgica, con Índice de Combinación de 0,7.

Resultados

Tabla 7: IC₅₀ de fosforilación de AKT, MAPK y mTOR tras tratamiento con ADW742 combinado con IMA.

| proteína | Línea celular | | | |
|----------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| | A673 | TC-71 | SK-ES-1 | A4573 |
| p-AKT | 0,567±0,09 | 0,176±0,01 | 0,217±0,08 | 0,61±0,06 |
| p-MAPK | 4,1±0,8 | >5 | 3,085±1,29 | 1,498±0,039 |
| p-m-TOR | 0,17±0,024 | 0,041±0,0034 | 0,087±0,0049 | 0,17±0,068 |

A673



TC-71

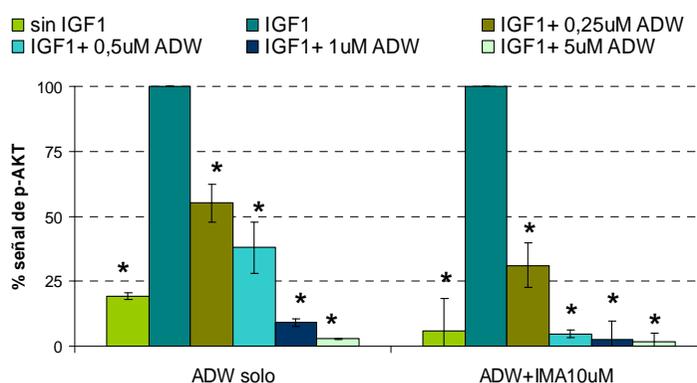
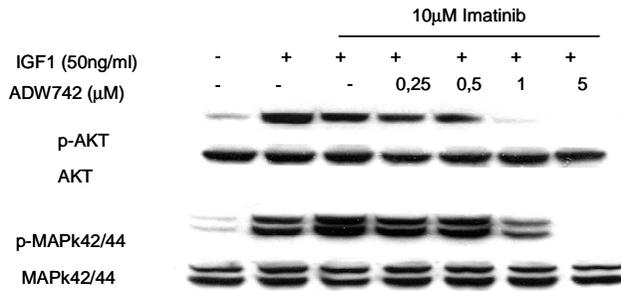


Figura 17: Análisis densitométrico de los WB obtenidos en el estudio de los efectos de la combinación de ADW con IMA a nivel de la ruta de IGF1R, donde se demuestra la sinergia entre ADW+IMA al inhibir la fosforilación de AKT. *: p<0,05, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para muestras independientes.

A)



B)

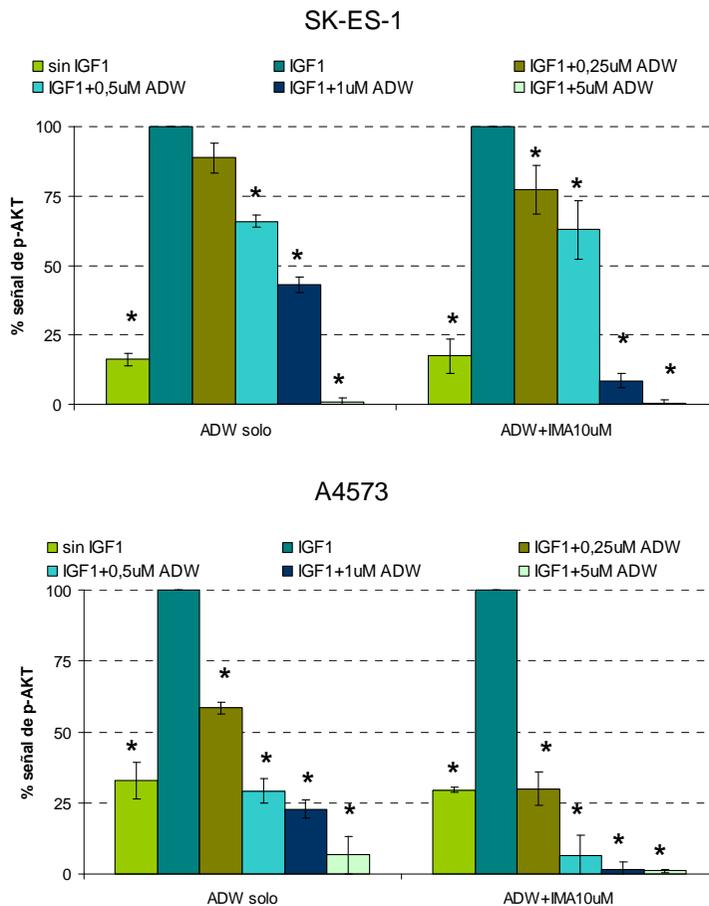


Figura 18: Efectos de la combinación de ADW con IMA en la ruta de señalización de IGF1R. A) *Western blotting* de la línea A4573. Se obtuvo una disminución de p-AKT y también de MAPK 42/44. B) Análisis densitométrico de los WB obtenidos en el estudio de los efectos de la combinación de ADW con IMA a nivel de la ruta de IGF1R, donde se demuestra la sinergia entre ADW+IMA al inhibir la fosforilación de AKT. *: $p < 0,05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para muestras independientes.

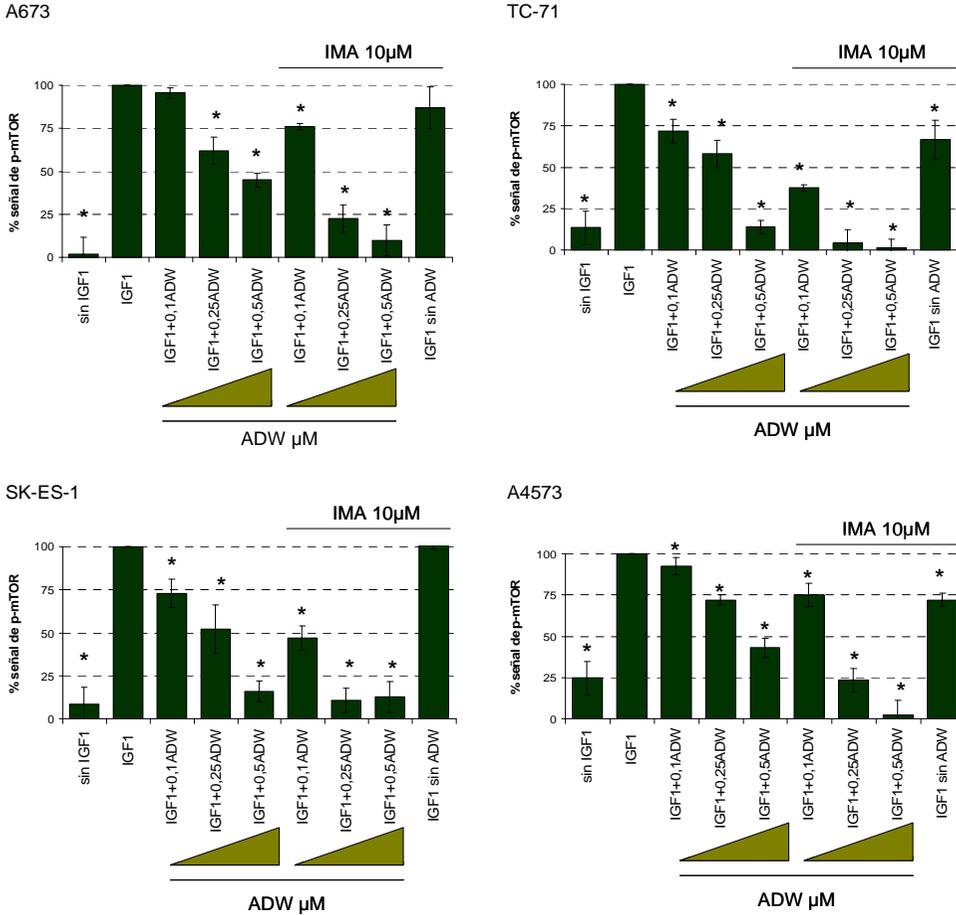


Figura 19: Análisis densitométrico de los WB obtenidos en el estudio de los efectos de la combinación de ADW con IMA a nivel de la fosforilación de m-TOR, donde se demuestra la sinergia entre ADW+IMA. *: $p < 0,05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para muestras independientes.

4.2.2 Efectos de la combinación de ADW+IMA en la proliferación de las líneas celulares de SE.

A continuación se estudiaron los efectos de combinar ADW+IMA en la proliferación de las células de SE. Con los datos obtenidos se hizo un ajuste no lineal de Hill de cada condición y se realizó un análisis isoblográfico de Loewe, revisto por Steel y Peckman, utilizando el IC_{50} de proliferación como dosis isoefectiva, para determinar la interacción de los dos compuestos.

Tabla 8: IC₅₀ de proliferación (μM) de las líneas celulares tratadas con IMA, a las 24 y 72 horas de tratamiento.

| Líneas celulares | 24 horas | 72 horas |
|------------------|----------------|----------------|
| A673 | 18,36 +/- 0,80 | 18,77 +/- 4,02 |
| TC71 | 17,45 +/- 0,79 | 22,00 +/- 3,20 |
| SK-ES-1 | 14,32 +/- 0,90 | 18,90 +/- 3,60 |
| A4573 | 15,08 +/- 1,11 | 20,12 +/- 2,21 |

Como se puede ver en la Figura 20, los resultados obtenidos dependen mucho de cada línea celular. De un modo global, se verificó que a las 24 horas de tratamiento se obtuvo únicamente aditividad (a la excepción de la línea A4573) y que a las 72 horas ya se obtuvo sinergia en casi todas las condiciones. La sinergia en esta situación fue bastante elevada, con Índices de Combinación del orden de 0,5. Este dato es importante porque sugiere una posible aplicación de Imatinib en la terapia de SE ya que aunque sólo no indujera una bajada muy fuerte de la proliferación, siendo combinado con ADW mejora su eficacia.

Resultados

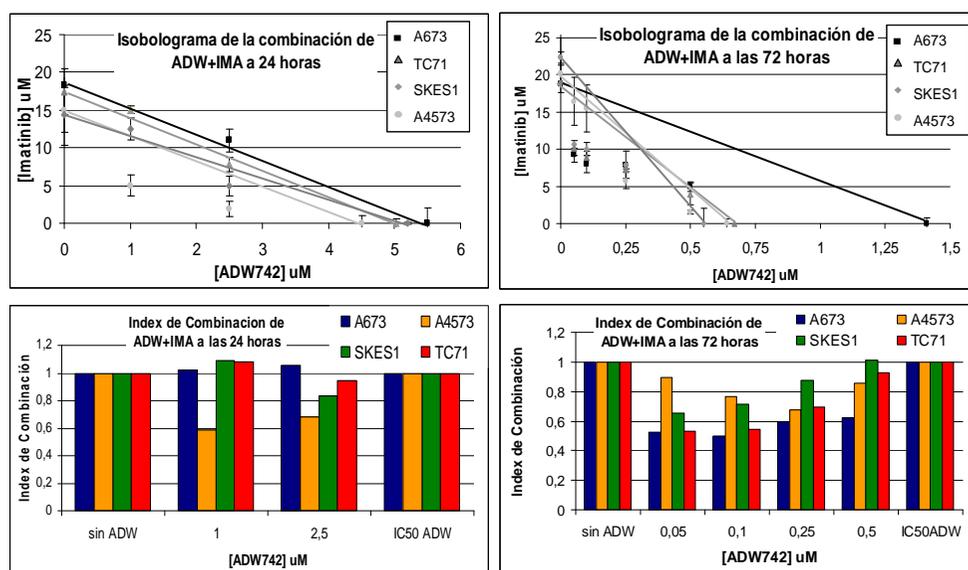


Figura 20: Representación isobolográfica de los efectos de la combinación de ADW+IMA en la proliferación celular y los correspondientes índices de combinación. En los isobogramas las líneas representan la zona de aditividad.

4.2.3 Efectos de la combinación de ADW+IMA en la apoptosis y ciclo celular de las líneas celulares de SE.

Seguidamente se ejecutaron estudios adicionales de la apoptosis y del ciclo celular, con el fin de determinar la razón de la inhibición de la proliferación de las células de SE tratadas con ADW+IMA.

Se verificó (Figura 21 y Figura 22), así como en los estudios de proliferación, que Imatinib por si solo no era capaz de inducir apoptosis pero cuando se combinaba con ADW, se obtenía una potenciación de la inducción de la apoptosis bastante significativa.

Resultados

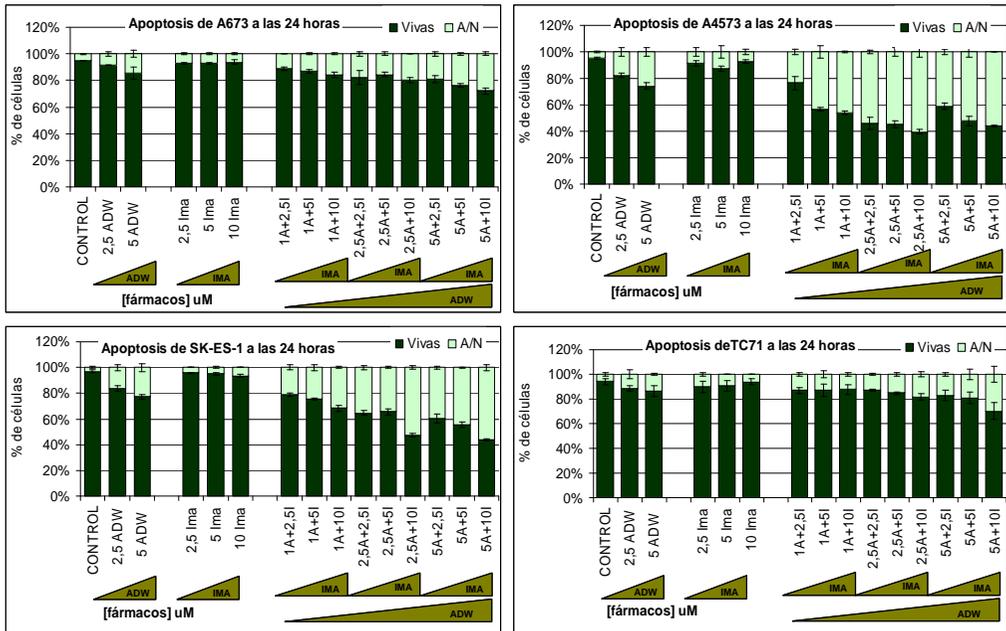
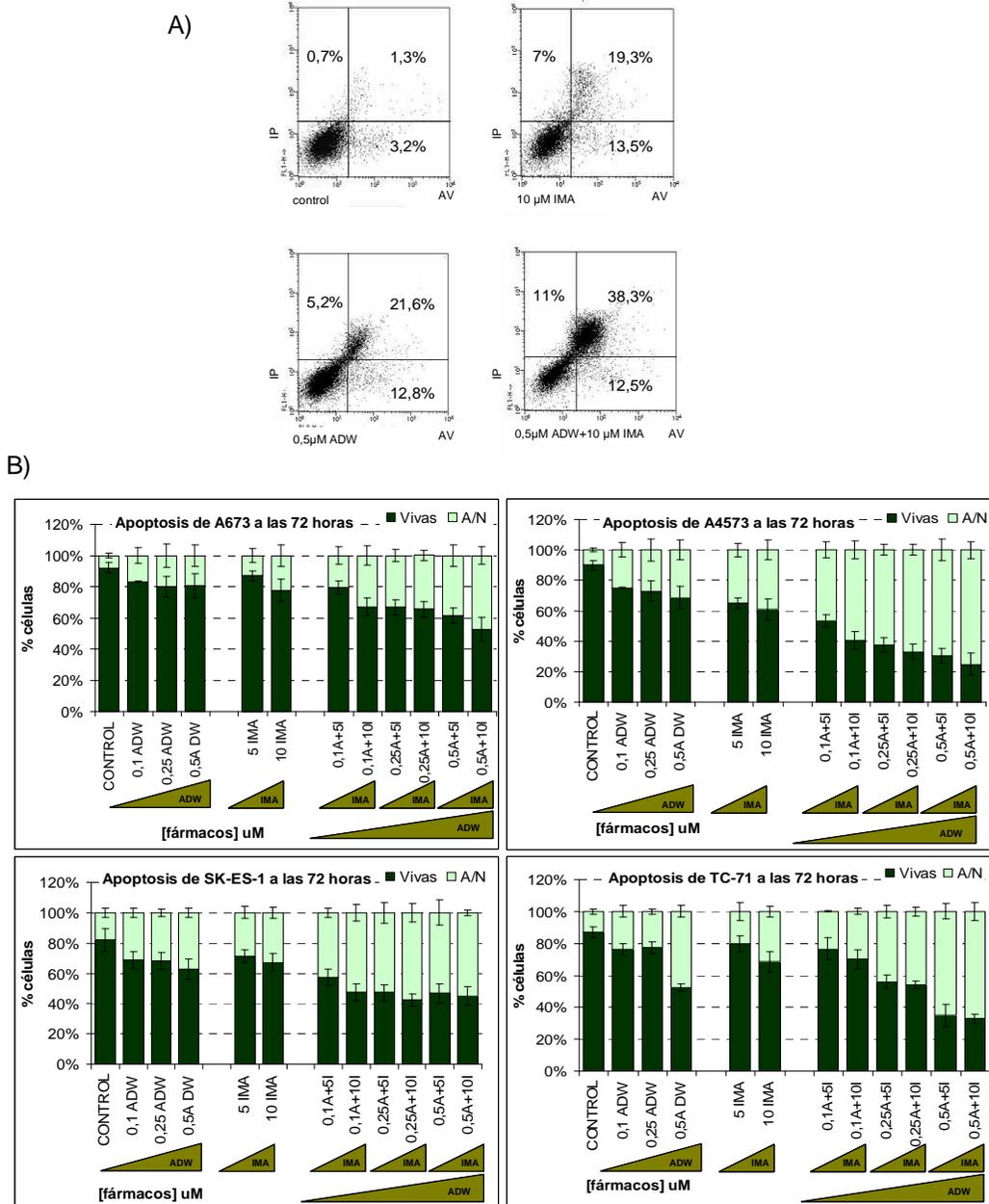


Figura 21: Efectos de la combinación de ADW con IMA a nivel de la inducción de la apoptosis, tras 24 horas de tratamiento. Imatinib por si solo no era capaz de inducir apoptosis pero si lo hace cuando se combinaba con ADW. A/N: apoptosis/necrosis

De una manera global, los resultados obtenidos en ambos tiempos de incubación son similares, siendo un poco más fuerte la inducción de apoptosis a las 72 horas de tratamiento. Además, tal como ocurrió

anteriormente, la línea A673 fue más resistente al tratamiento que las demás.



Resultados

Resultados

Con relación a los estudios del ciclo celular, una vez más los resultados obtenidos son una parada en la fase G1, más acentuada a partir de las 24 horas. El tratamiento con Imatinib tuvo los mismos efectos que con ADW742 y no produjo efectos sinérgicos a la hora de la combinación (en la Figura 23, se ejemplifica los resultados obtenidos con la línea A4573, siendo los resultados de las demás líneas similares).

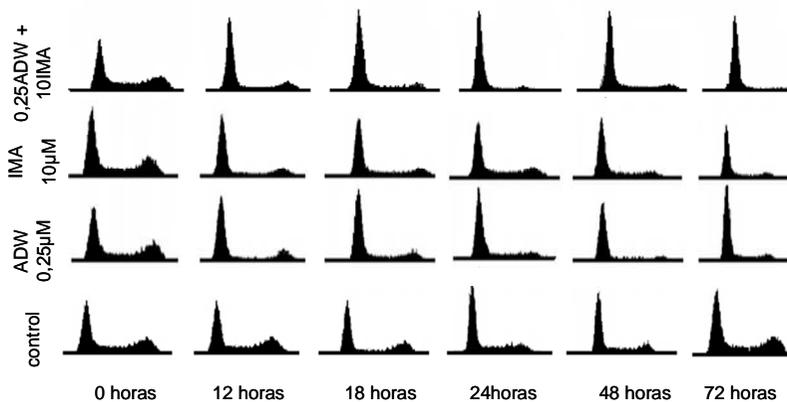


Figura 23: Efectos de la combinación de ADW con IMA en la progresión del ciclo celular. Histograma de la línea A4573. Se obtuvo una disminución del número de células en la fase S, con parada en la fase G1. Imatinib no mejoró los efectos de ADW.

Con estos estudios se verificó que el efecto principal de la combinación de estos dos fármacos era la inducción de la apoptosis, ya que el Imatinib no era capaz de mejorar los efectos de ADW742 a nivel del ciclo celular.

4.2.4 Efectos de la combinación de ADW+IMA en los niveles de VEGF

Como se había descrito que alteraciones en la ruta de IGF1R podrían tener efectos proangiogénicos en SE (219), se decidió también estudiar los niveles del FCVE (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial VEGF) secretado

para el medio celular, en condiciones control y bajo tratamiento con ADW y/o IMA.

Se demostró que se reducían los niveles de VEGF tras tratamiento, obteniéndose una reducción entre el 10% (en el caso de la línea A673) y del 35% (en el caso de la línea A4573). La combinación presentó efectos aditivos, con un 30-40% de más inhibición que el mono-tratamiento.

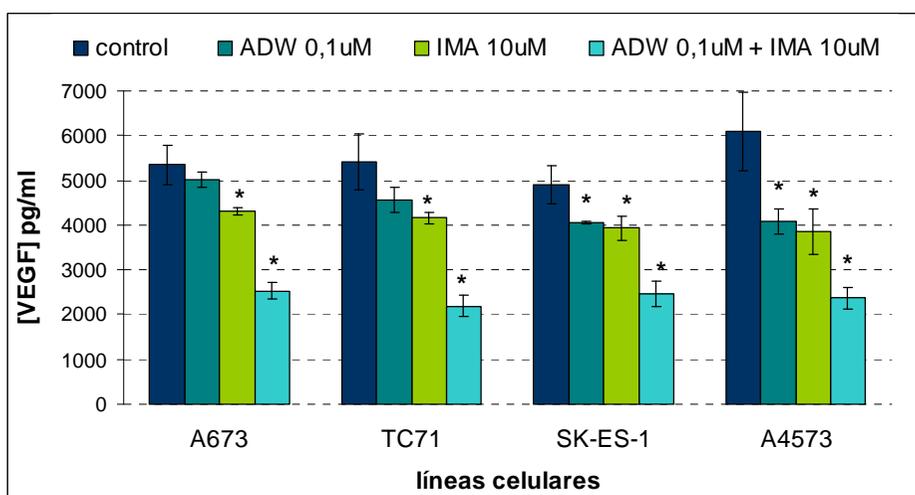


Figura 24: Efectos de ADW combinado con IMA en los niveles de VEGF secretado para el medio extracelular. Todas las líneas celulares fueron tratadas durante 72 horas. El tratamiento con ADW ó IMA redujo significativamente los niveles de VEGF, especialmente en la línea A4573. La combinación de ADW+IMA tuvo efectos aditivos. *: $p < 0,05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para muestras independientes.

4.3 Estudio de los efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la terapia convencional de SE.

Visto que se comprobó que la combinación de ADW con IMA podría tener aplicaciones interesantes en la terapia de SE, pero que dependía mucho del tipo celular en que se estaba trabajando, se decidió también estudiar los efectos de combinar este fármaco con Doxorubicina y Vincristina, dos fármacos utilizados en la terapia de pacientes con SE.

4.3.1 Efectos de la combinación de ADW+DXR ó VCR en la ruta de señalización de IGF1R.

Tal como se hizo con IMA, se empezó por estudiar los efectos de las combinaciones a nivel de la ruta de señalización de IGF1R. Como se verificó anteriormente, la principal diana de estos tratamientos fue p-AKT, obteniéndose una reducción bastante significativa del IC₅₀ de fosforilación (Tabla 9). Con relación a MAPK42/44, una vez más no se obtuvieron cambios significativos en la inhibición de su fosforilación (a la excepción de la línea A4573, que era la línea que tenía niveles más altos de IGF1R/p-IGF1R).

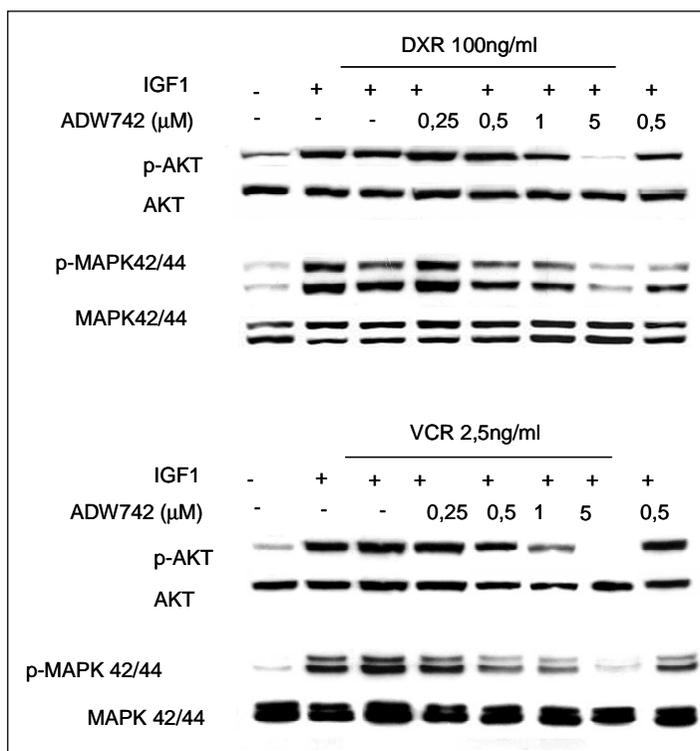


Figura 25: Efectos de la combinación de ADW con DXR/VCR en la ruta de señalización de IGF1R. *Western blotting* de la línea A4573. Se obtuvo una disminución de p-AKT y también de MAPK 42/44.

Tabla 9: IC₅₀ de fosforilación de AKT y MAPK tras tratamiento con ADW742 combinado con DXR ó VCR.

| fármacos | proteína | Línea celular | | | |
|----------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | A673 | TC-71 | SK-ES-1 | A4573 |
| ADW +DXR | p-AKT | 0,550 +/- 0,080 | 0,231+/- 0,078 | 0,186 +/- 0,030 | 0,680 +/- 0,090 |
| | p-MAPK | > 5 | 4,50 +/- 1,200 | 3,6 +/- 2,390 | 1,385 +/- 0,890 |
| ADW +VCR | p-AKT | 0,970 +/- 0,890 | 0,291+/- 0,093 | 0,230 +/- 0,093 | 0,875 +/- 0,087 |
| | p-MAPK | > 5 | 4,610 +/- 0,520 | 3,656 +/- 2,310 | 0,930 +/- 0,028 |

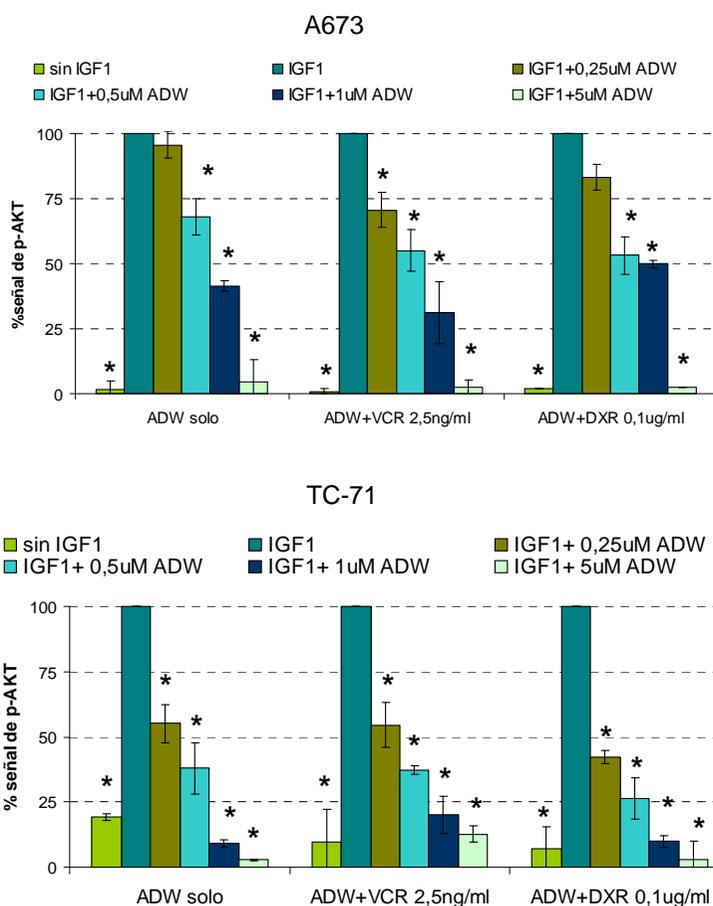


Figura 26: Análisis densitométrico de los WB obtenidos en el estudio de los efectos de la combinación de ADW con DXR/VCR a nivel de la ruta de IGF1R, de las líneas A673 y TC-71, donde se demuestra la sinergia de las combinaciones al inhibir la fosforilación de AKT. *: p<0,05, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para muestras independientes.

Resultados

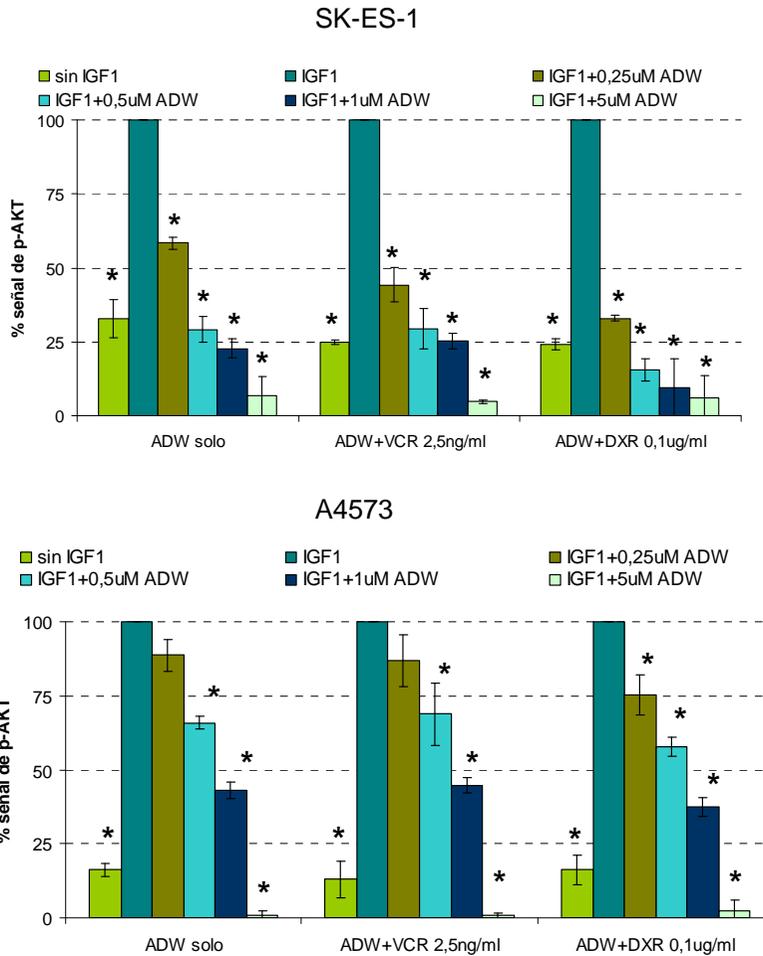


Figura 27: Análisis densitométrico de los WB obtenidos en el estudio de los efectos de la combinación de ADW con DXR/VCR a nivel de la ruta de IGF1R, de las líneas A4573 y SK-ES-1, donde se demuestra la sinergia de las combinaciones al inhibir la fosforilación de AKT. *: $p < 0,05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para muestras independientes.

4.3.2 Efectos de la combinación de ADW+DXR ó VCR en la proliferación de las líneas celulares de SE.

De manera análoga a lo que se había visto anteriormente con el tratamiento con ADW+IMA, las combinaciones de ADW+DXR ó VCR indujeron una inhibición de la proliferación dosis-dependiente, teniendo las

líneas celulares comportamientos idénticos. Se ha visto que ambas combinaciones inhibían el crecimiento celular sinérgicamente, fuese a las 24 ó a las 72 horas de tratamiento. En el caso de la línea SK-ES-1, estos efectos fueron menos notorios.

Tabla 10: IC₅₀ de proliferación (ng/ml) de las líneas celulares tratadas con DXR ó VCR, a las 24 y 72 horas de tratamiento.

| fármaco | Líneas celulares | 24 horas | 72 horas |
|---------|------------------|---------------|---------------|
| DXR | A673 | 1110 +/- 0,10 | 276 +/- 35,17 |
| | TC-71 | 260 +/- 0,09 | 82 +/- 11,8 |
| | SK-ES-1 | 170 +/- 0,05 | 86 +/- 8,24 |
| | A4573 | 250 +/- 0,06 | 65,5 +/- 3,06 |
| VCR | A673 | 8,05 +/- 0,80 | 3,20 +/- 0,35 |
| | TC-71 | 5,67 +/- 0,75 | 3,76 +/- 0,43 |
| | SK-ES-1 | 6,67 +/- 0,30 | 3,5 +/- 0,19 |
| | A4573 | 5,77 +/- 0,34 | 3,7 +/- 0,27 |

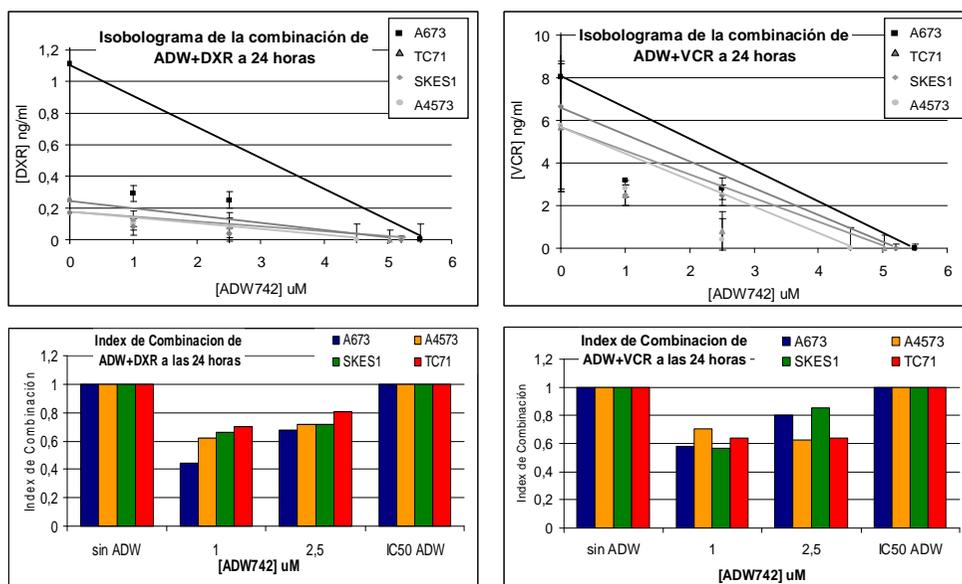


Figura 28: Representación isoblográfica de los efectos de la combinación de ADW+IMA en la proliferación celular y los Indexes de Combinación de ADW+DXR ó VCR, en todas las líneas celulares, a las 24 tratamiento.

Resultados

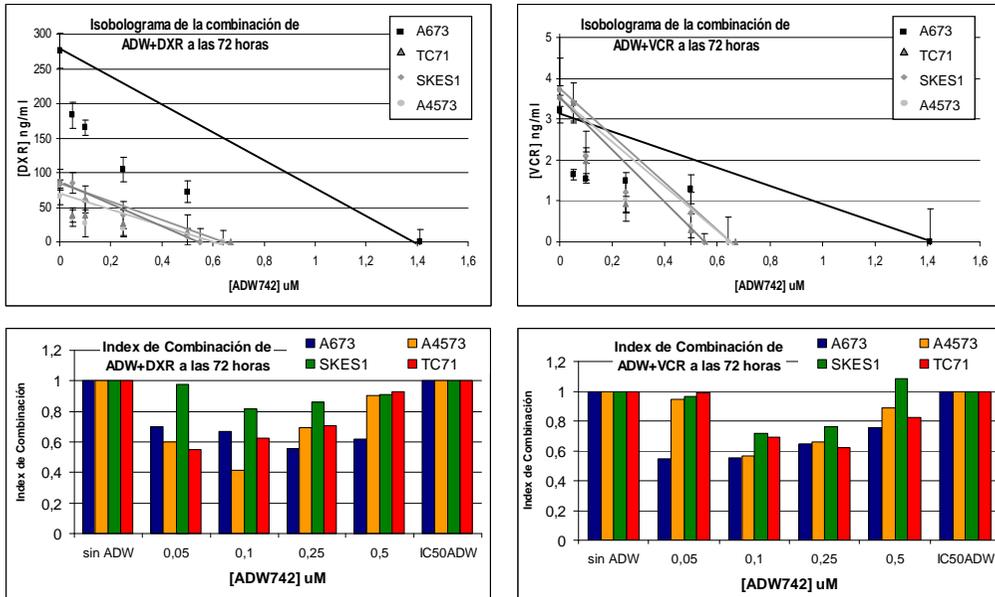
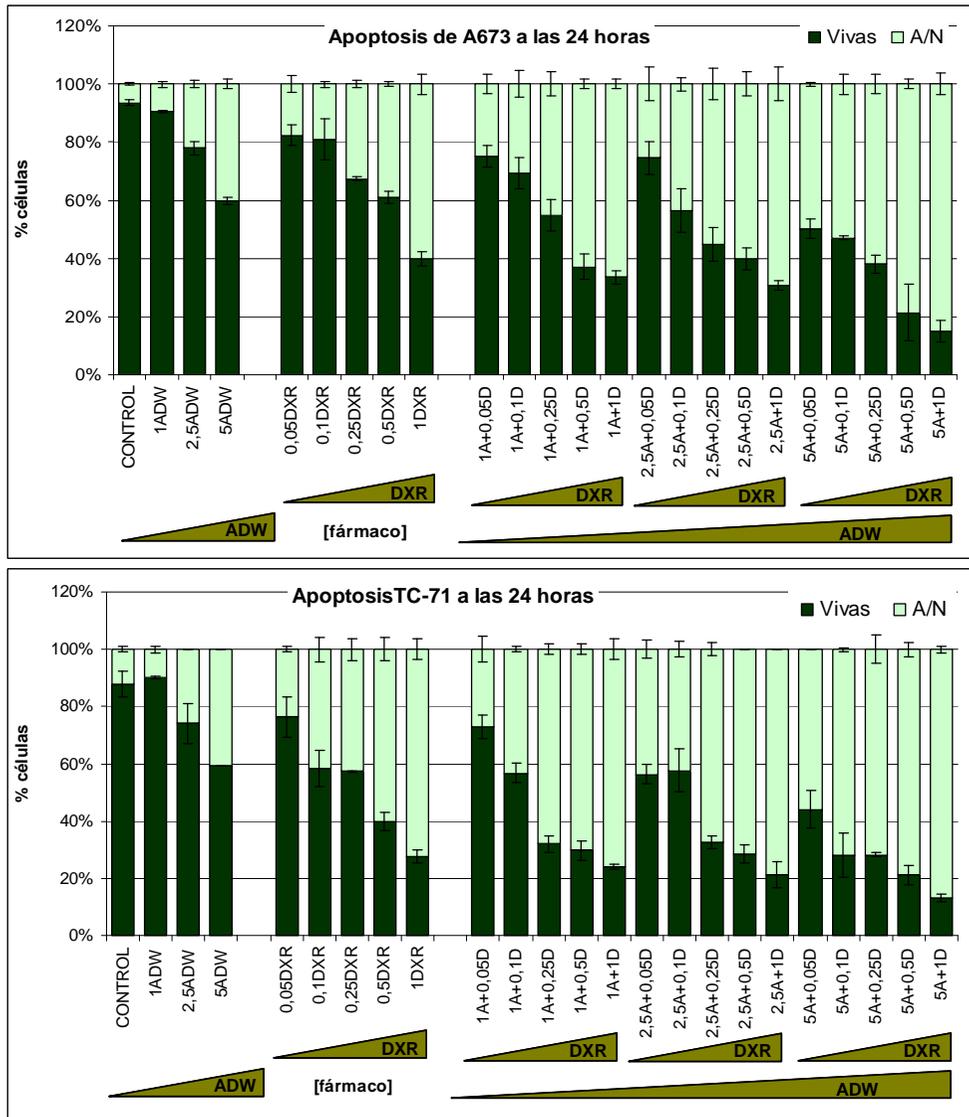


Figura 29: Representación isoblográfica de los efectos de la combinación de ADW+IMA en la proliferación celular y los Índices de Combinación de ADW+DXR ó VCR, en todas las líneas celulares, a las 72 horas de tratamiento. La línea SK-ES-1 fue menos sensible al tratamiento con DXR a las 72 horas de tratamiento.

4.3.3 Efectos de la combinación de ADW+DXR ó VCR en la apoptosis y ciclo celular de las líneas celulares de SE.

Tal y como sería de esperar (ya que estos dos fármacos tienen efectos citotóxicos) el principal efecto de ambas combinaciones fue la inducción de la apoptosis, hasta un 75% más que en el caso del monotratamiento. No se han verificado grandes diferencias entre los dos tiempos de incubación ni de las líneas celulares. En estas situaciones solamente se han detectado efectos sinérgicos en el caso de la línea A4573, con IC de 0,74-0,87.



Resultados

Figura 30: Efectos de la combinación de ADW+DXR en la inducción de apoptosis de las líneas A673 y TC-71, a las 24 horas de tratamiento. La combinación resultó en un incremento adicional del 20% de apoptosis. A/N: apoptosis/ necrosis.

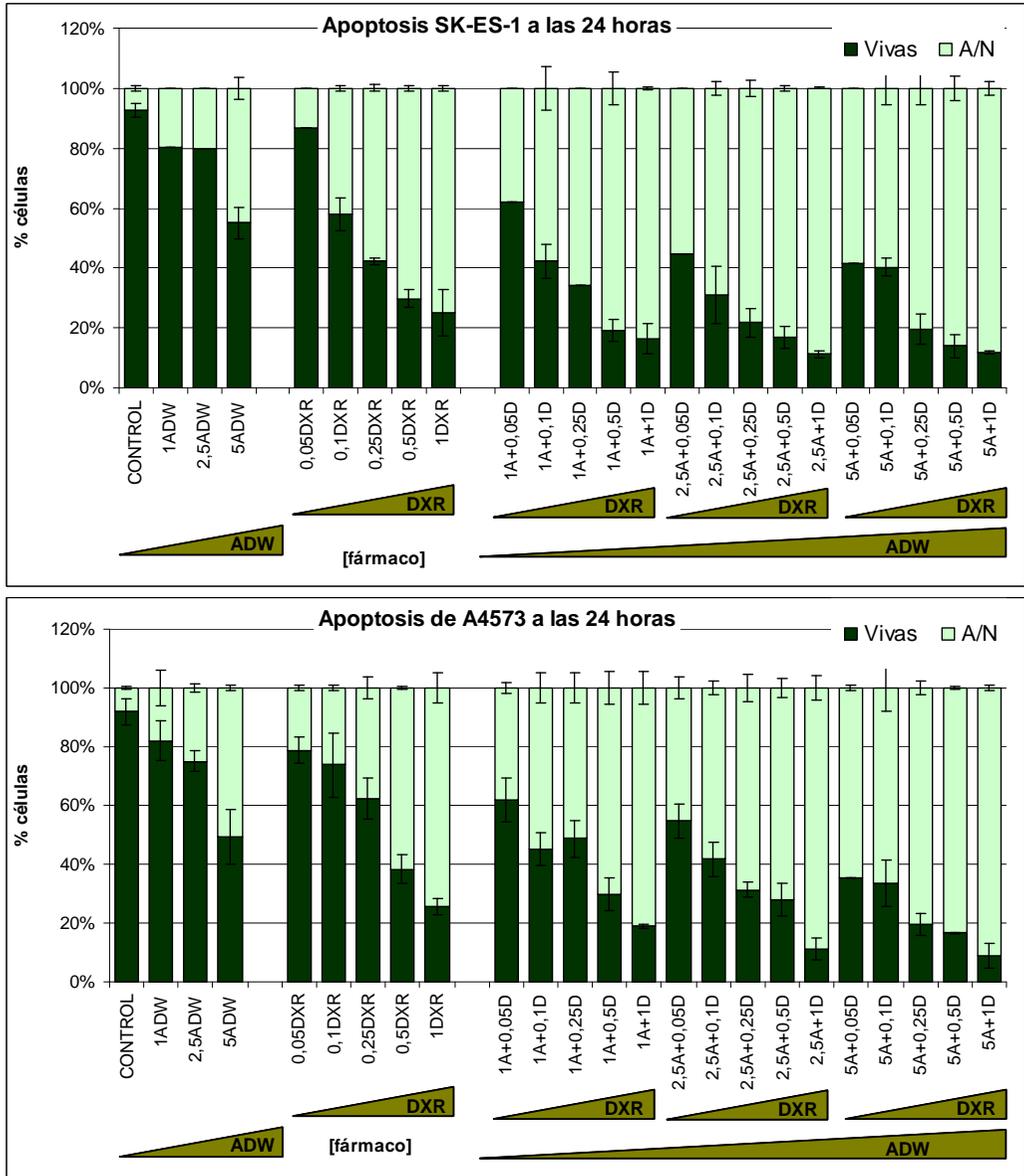


Figura 31: Efectos de la combinación de ADW+DXR en la inducción de apoptosis de las líneas SK-ES-1 y A4573, a las 24 horas de tratamiento. La combinación resultó en un incremento adicional del 30-40% de apoptosis. A/N: apoptosis/ necrosis.

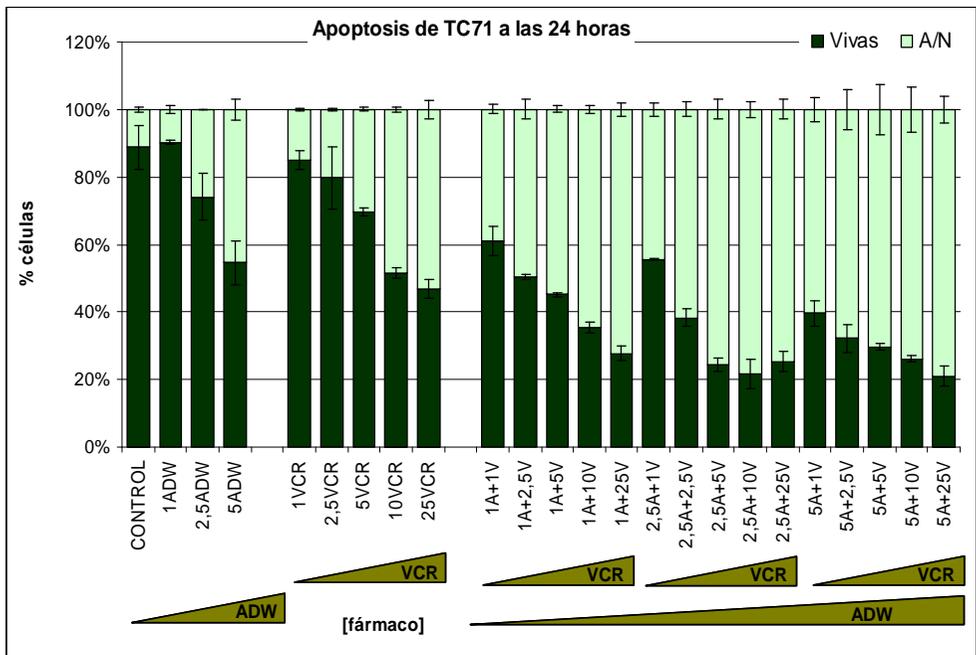
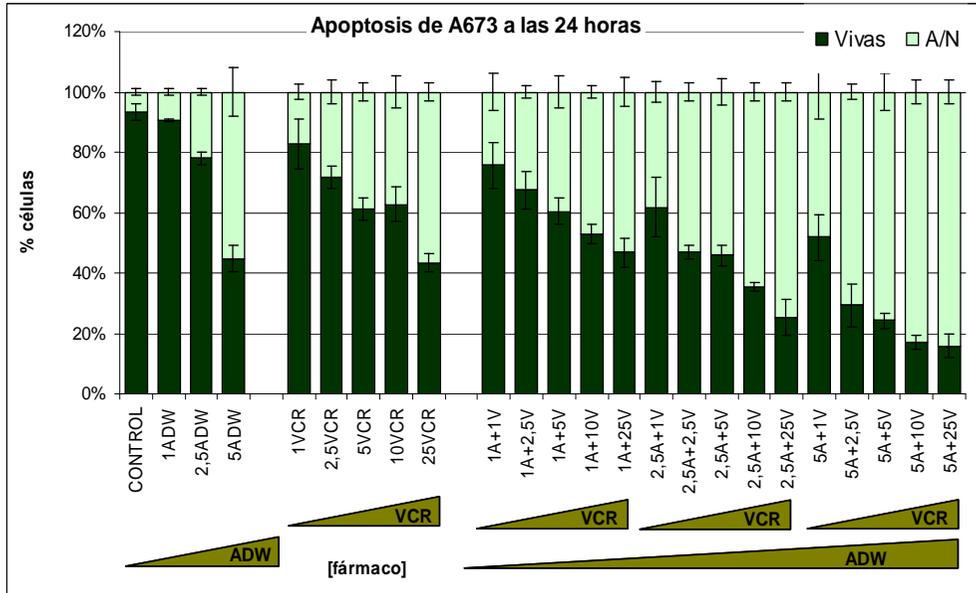


Figura 32: Efectos de la combinación de ADW+VCR en la inducción de apoptosis de las líneas A673 y TC71, a las 24 horas de tratamiento. La combinación resultó en un incremento adicional del 30% de apoptosis. A/N: apoptosis / necrosis.

Resultados

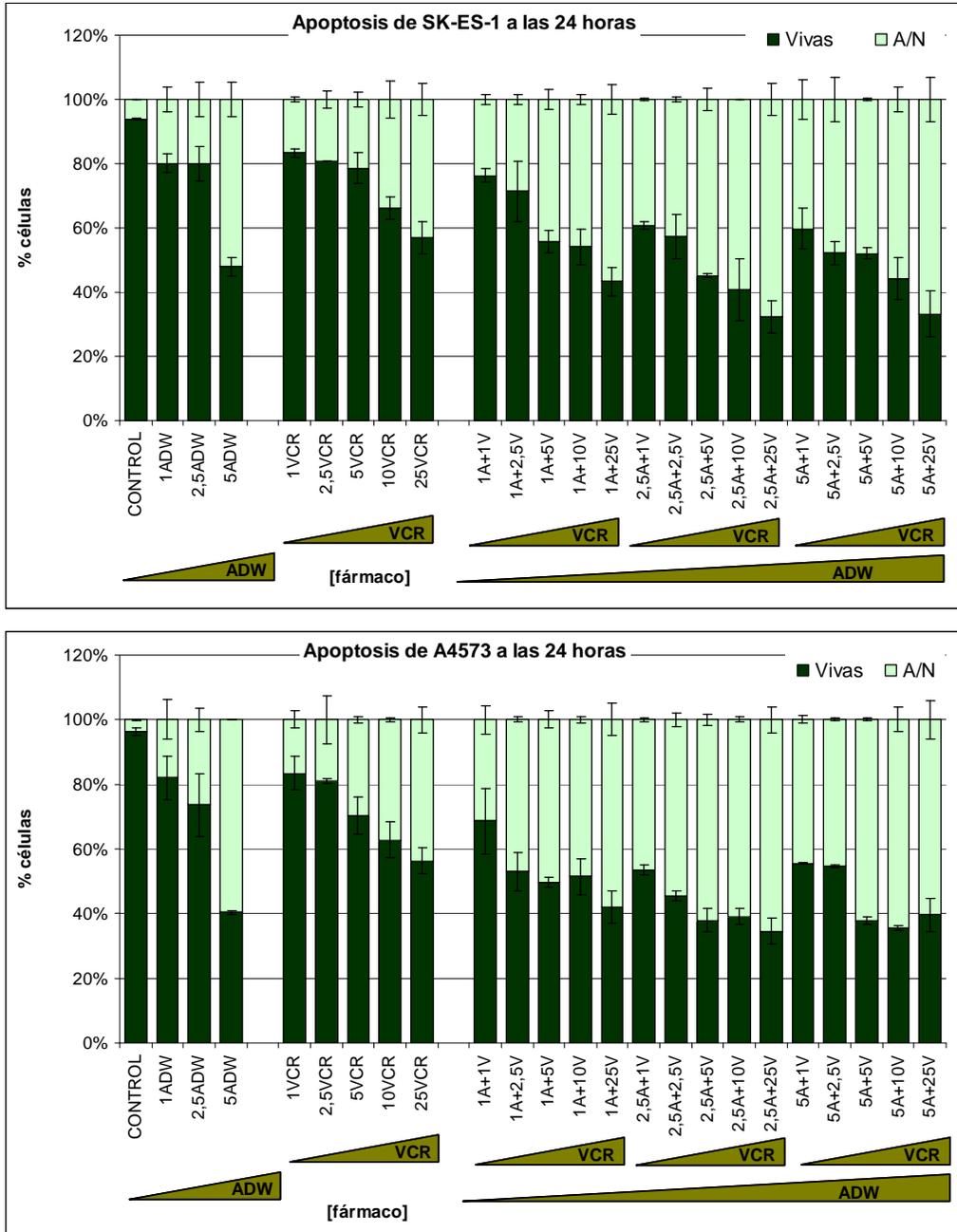
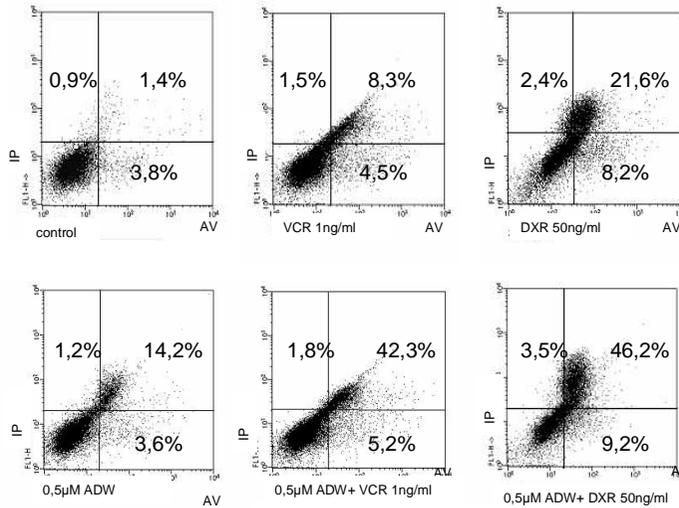
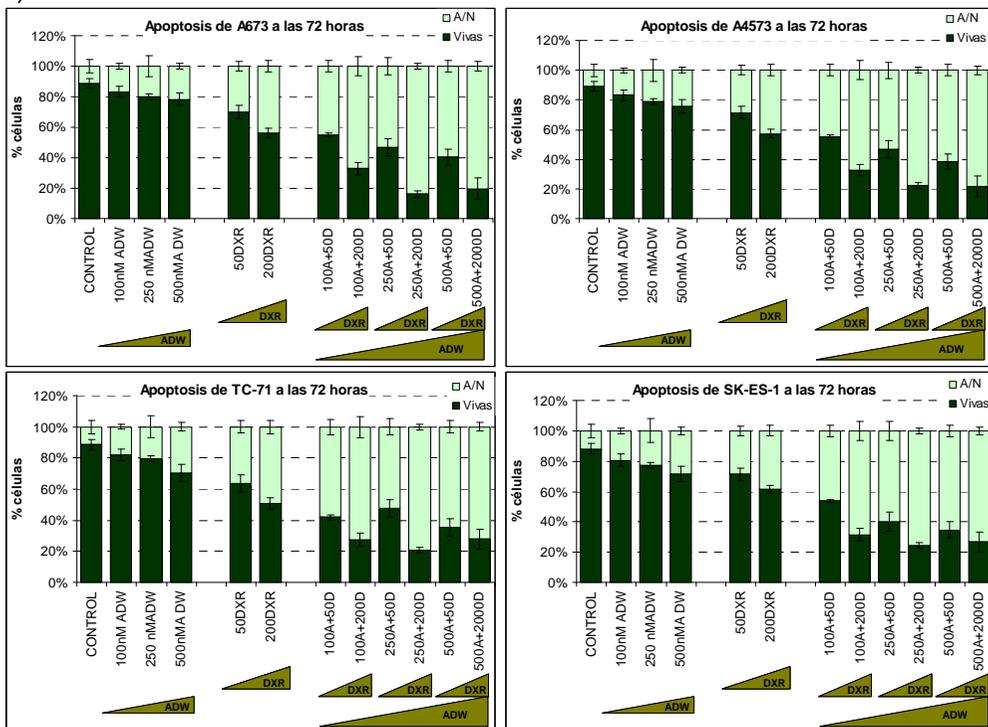


Figura 33: Efectos de la combinación de ADW+VCR en la inducción de apoptosis de las líneas SK-ES-1 y A4573, a las 24 horas de tratamiento. La combinación resultó en un incremento adicional del 30-40% de apoptosis. A/N: apoptosis/ necrosis.

A)



B)



Resultados

Figura 34: Efectos de la combinación de ADW+DXR en la inducción de apoptosis de todas las líneas, a las 72 horas de tratamiento. A) Histograma obtenido para algunas de las condiciones del tratamiento de la línea A4573. B) Representación gráfica de todas las condiciones del tratamiento. La combinación resultó en un incremento adicional del 20% de apoptosis. A/N: apoptosis/ necrosis.

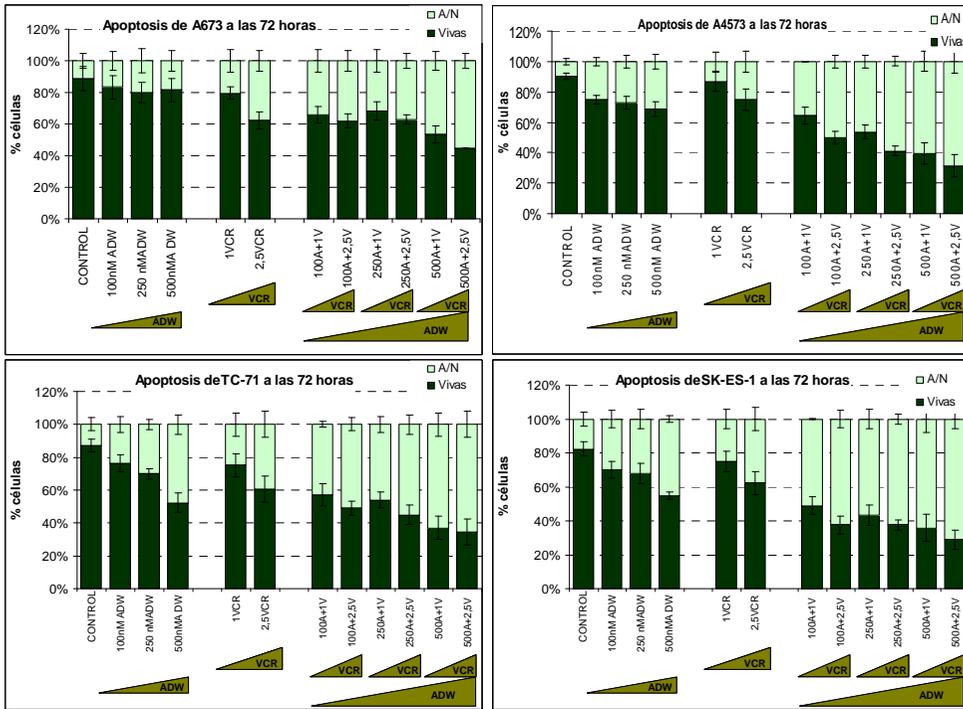


Figura 35: Efectos de la combinación de ADW+VCR en la inducción de apoptosis de todas las líneas, a las 72 horas de tratamiento. La combinación resultó en un incremento adicional del 30-40% de apoptosis. A/N: apoptosis/ necrosis.

En los estudios de ciclo celular se verificó que los efectos de las combinaciones eran parcialmente antagónicos: con el tratamiento con DXR ó VCR (solos) se observó una parada del ciclo celular en la fase G2/M, con reducción del número de células en la fase G1 mientras que con el tratamiento con ADW se observó una parada en la fase G1. Sin embargo, se ha observado un alto grado de inducción de apoptosis (pico pré-G1), lo que comprueba la hipótesis de que los efectos de la combinación se dan por una inducción de la apoptosis.

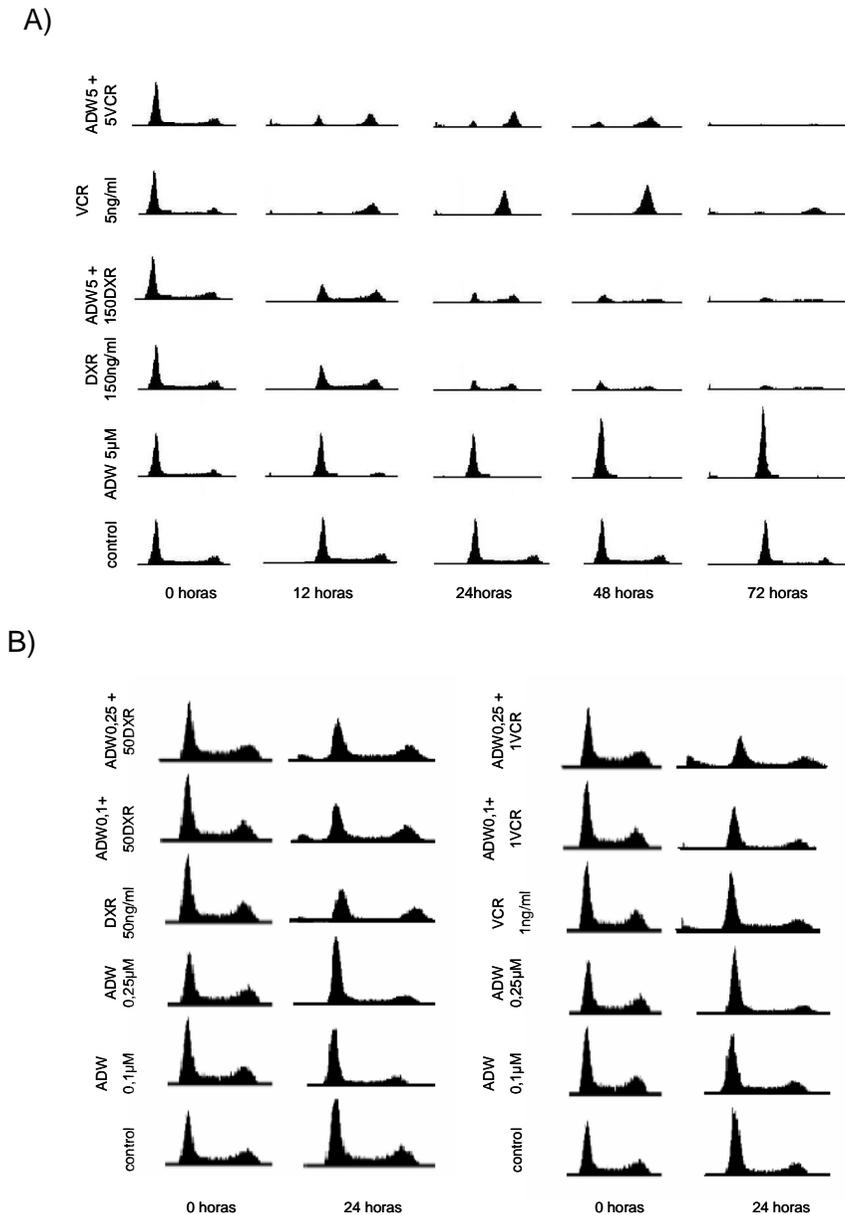


Figura 36: Efectos de la combinación de ADW con DXR ó VCR en el ciclo celular de las células de SE. A) Histograma de la línea A4573 tratada con las concentraciones de ADW, DXR ó VCR utilizadas para los estudios de 24 horas. B) Histograma de la línea A4573 tratada con las concentraciones de ADW, DXR ó VCR utilizadas para los estudios de 24 horas. Se obtuvo una parada del ciclo celular en la fase G2/M, con reducción del número de células en la fase G1 con el tratamiento con DXR ó VCR y con el tratamiento con ADW se observó una parada en la fase G1. Se ha observado un alto grado de inducción de apoptosis (pico pré-G1) en los tratamientos con DXR y VCR.

4.3.4 Efectos de la combinación de ADW+DXR, VCR ó IMA en la movilidad y crecimiento en agar blando.

Para poder caracterizar un poco mejor la interacción de ADW con DXR, VCR ó IMA y tener una aproximación de los resultados obtenidos *in vitro* más cercana al comportamiento de las células tumorales (*in vivo*), se realizaron dos estudios adicionales, de crecimiento independiente de anclaje y de movilidad celular.

En los estudios de movilidad celular se verificó que las concentraciones más elevadas (las utilizadas en los estudios a las 24 horas de tratamiento) inducían altos niveles de apoptosis, con total parada de la movilidad celular. Sorprendentemente, con concentraciones 10-20x menores (las utilizadas en los estudios de 72 horas) también se obtuvo parada de la movilidad celular, incluso con concentraciones tan bajas como 0,1 μ M de ADW. En estas condiciones, al combinar ADW con IMA, DXR ó VCR se obtuvo no solamente parada de movilidad celular sino también inducción de apoptosis, pudiéndose observar un ligero cambio de la morfología celular, pasando las células a ser más redondeadas y con menos “extensiones-similar-a-dendritas”, tan características de estos tipos celulares. Estos resultados sugieren posibles aplicaciones terapéuticas a la hora de inhibir posible metastatización (en estos estudios, no se han detectado diferencias de sensibilidad entre las diferentes líneas celulares por lo que se presentan únicamente los resultados obtenidos para la línea A4573).

Con relación a los estudios de crecimiento independiente de anclaje, todas las líneas celulares presentaron comportamiento similar. El número de colonias que se formó fue bastante menor en los casos de las combinaciones respecto a los del mono-tratamiento lo que indicó que, a parte de inducir apoptosis, la terapia combinatoria también tiene ventajas a la hora de la inhibición del crecimiento tumoral. Es de resaltar el hecho de que

en estos casos, el numero de colonias cayó drásticamente en cualquier tratamiento, sugiriendo la posibilidad de que *in vivo*, los efectos de esta terapia sean muy satisfactorios.

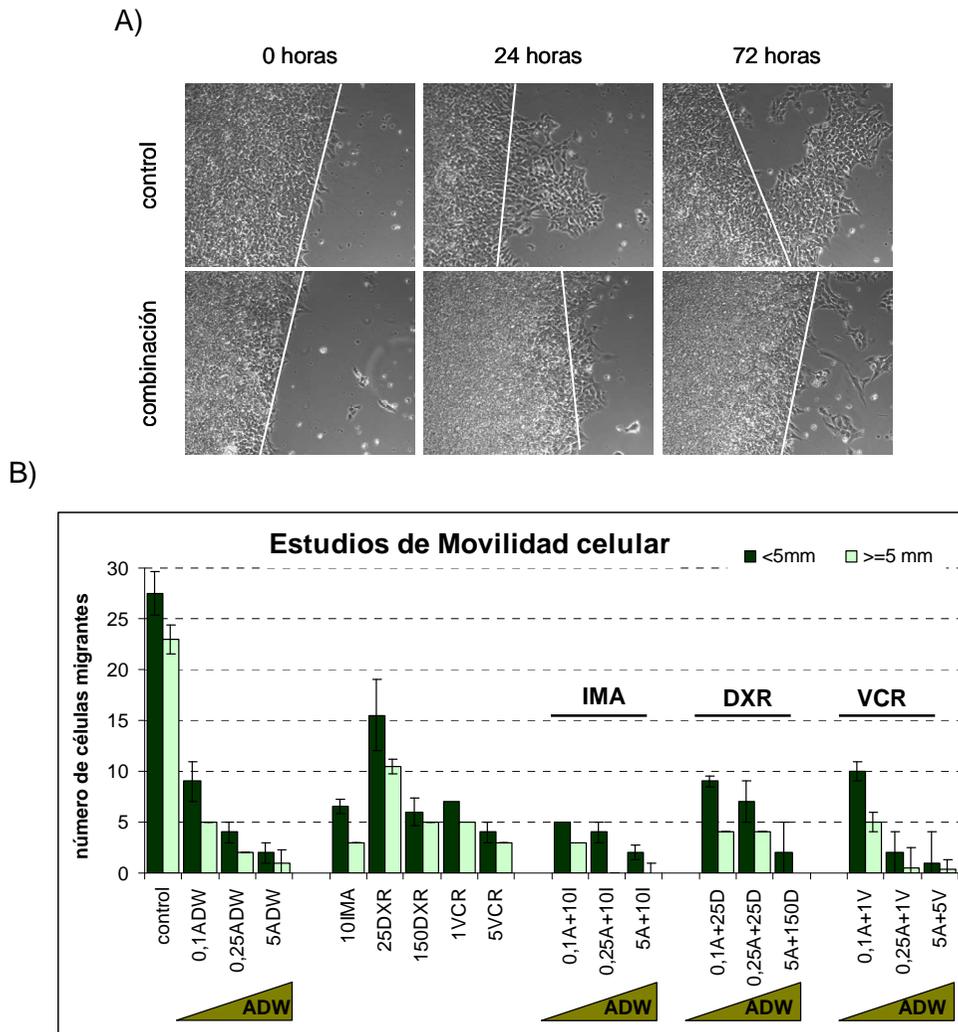
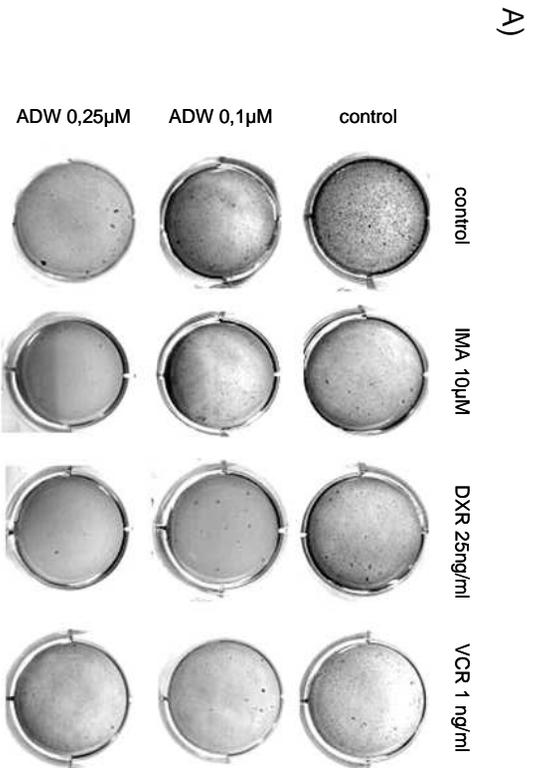


Figura 37: Movilidad de las células de SE tratadas con ADW y DXR, VCR ó IMA. A) Ejemplo de los resultados obtenidos con la línea A4573. La línea blanca representa la zona del corte que se hizo después de que el crecimiento alcanzara la confluencia y a partir de la cual se calculó la distancia que las células de SE alcanzaron. B) Representación gráfica de los resultados obtenidos. En todas las líneas celulares los resultados fueron similares, obteniéndose total parada de movilidad en el caso de las combinaciones.



B)

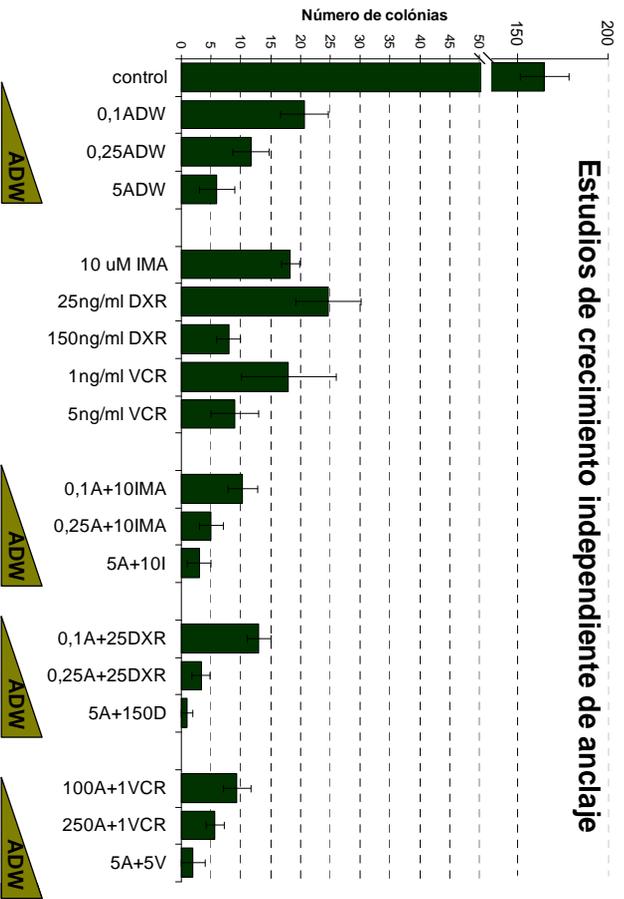


Figura 38: Estudios del crecimiento independiente de anclaje. A) Imagen de algunas condiciones de la línea A4573 tratada con ADW e IMA, DXR ó VCR. B) Representación gráfica de todas las condiciones de tratamiento. Se obtuvo una marcada reducción del número de colonias tras tratamiento, sugiriendo que ADW combinado con IMA, DXR ó VCR podrá parar al crecimiento tumoral.

4.4. Identificación del patrón de expresión proteica de líneas de Sarcoma de Ewing tratadas con ADW742 y/o Imatinib y su relación con la resistencia de dichas células tumorales al tratamiento con distintos fármacos.

Una vez que en los estudios anteriores se verificó que la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit tenía efectos sinérgicos a nivel de la inhibición de proliferación, inducción de apoptosis y bloqueo de la ruta de señalización, se decidió hacer un estudio proteómico para poder caracterizar de un modo más amplio los cambios de expresión proteica inducidos en las células de SE tras tratamiento.

Con este estudio también se pretendió analizar todo el proteoma de las 2 líneas de SE que resultaron tener comportamientos más distintos a nivel de sensibilidad a los tratamientos. Así se pretendió identificar proteínas cuya expresión variase entre estas dos líneas e identificar las proteínas que pudiesen estar relacionadas con la sensibilidad/resistencia al tratamiento.

Inicialmente se trató la línea A673 y A4573 (las líneas más resistente y sensible al tratamiento, respectivamente) con 0,1 μ M de ADW y/o 10 μ M de IMA, durante 24 y 72 horas, haciendo a continuación los respectivos extractos proteicos y analizando el proteoma con una electroforesis bidimensional.

De cada uno de los geles obtenidos se ejecutó un análisis manual comparativo de los cambios de expresión de los puntos proteicos más relevantes y estos fueron analizados por espectroscopia de masas MALDI-ToF (se presenta un ejemplo de los resultados obtenidos con los geles 2D en la Figura 39 y en la Tabla 11 las proteínas identificadas con el MALDI-ToF).

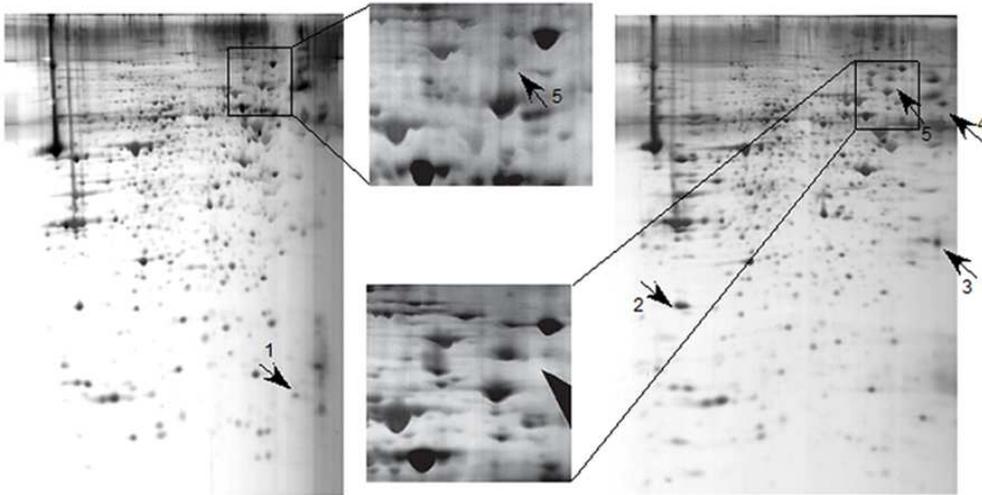


Figura 39: Resultados de dos geles 2D de la línea A673. El panel de la izquierda se tiene una situación control y el de la derecha una del tratamiento con ADW. Después de realizada la segunda dimensión se hizo un análisis manual de los puntos proteicos con cambios más relevantes y estos se analizaron por MALDI-ToF. Las proteínas resaltadas en la imagen son: 1 y 3- no determinadas por tener un *score* bajo; 2- PRDX1, 4- NASP, 5-HSP90. La imagen de *close-up* presenta los cambios de expresión de la proteína HSP90.

Con los estudios de espectroscopia de masas MALDI-ToF se ha detectado un gran número de proteínas cuya expresión se encontraba alterada bajo tratamiento (en estos análisis se eligió un nivel de “*minimal store*” de identidad de 65), que se han resumido en la Tabla 11.

Como se puede verificar en la Tabla 11 y en la Figura 40, las proteínas detectadas estaban involucradas en numerosos procesos celulares importantes, como es el caso de la regulación de la proliferación (EBP1, RhoA), la apoptosis (Set, 14-3-3) y la respuesta al stress (GRP75, HSP90, HSP70).

Tabla 11: Proteínas identificadas con los estudios de electroforesis 2D/MALDI-ToF. Cada proteína fue identificada por “*matching peptide-mass fingerprinting*” contra una base de datos no-redundante humana de Swiss-Prot. Las proteínas marcadas con * fueron caracterizadas a nivel de ARNm y proteína.

| Nº Acceso | Descripción | Score | Línea celular | Expresión |
|---------------------|--|------------------------|---------------|--------------|
| P27348* | 1433T; 14-3-3 proteína Theta (Tau) | 162 | A4573 | Sobre |
| Q25010+ P84184 | ACT3A; Actina, citoplasmática A3a ACT3B; Actina, citoplasmática A3b | 171 138 | A4573 | Sub sub |
| P23793 | ARCA; arginina desaminasa | 193 | A4573 | Sobre |
| Q92499 | DDX1; Helicasa depend. ATP-DDX1 | 80 | A4573 | Sobre |
| Q92630 | DYRK2; Reg. especif. pTyr-Ki2 | 67 | A4573 | Sobre |
| P26641 | EF1G; Factor Elongación 1-gamma | 143 | A673 | Sub |
| P38646* | GRP75; Prot. Choq. Term. 70, percu. mit. | 368 | A4573 | Sub |
| P08238*+ P07900* | HS90B y A; Proteína choque térmico 90 beta y alpha | 176 + 174 120 + 109 | A673 A4573 | Over over |
| P11142* | HSP7C; Proteína choque térmico 71kDaprot (HSP70) | 99 | A4573 | Sub |
| P16144 | ITB4; isoforma splice Beta-4B | 70 | A673 | Sub |
| P05455 | LA; proteína Lupus La | 72 | A4573 | Sobre |
| P49321 | NASP; isoforma splic. 2 y 1 | 120 + 90 | A673 | Sobre |
| Q9Y4L1 | OXR1; Prot. Reg Oxi.- 150kDa | 132 | A673 | Sub |
| Q9UQ80* | PA2G4; Prot. Ass. Proli. 2G4 (EBP1) | 206 | A673 | Sub |
| Q06830 | PRDX1; Peroxiredoxina 1 | 279 195 | A4573 A673 | Sub sobre |
| P28066 | PSA5; Proteasa Subu. Alpha tipo 5. | 106 | A673 | Sub |
| Q9NTK5 | PTD4; Prot. Ligación GTP isoforma splice 1 y 2 | 145 112 | A673 | Sobre |
| P61586* | RhoA; Transf. prot. RhoA | 94 | A673 | Sub |
| P08865 | RSSA; Prot. ribosomal 40S (p40) | 147 | A4573 | Sobre |
| Q01105* | SET; Prot. SET (I-2PP2A) | 64 | A4573 | Sub |
| Q96FJ0 | STALP; Proteasa AMSH -like | 75 | A4573 | Sobre |
| P13693* | TCTP; Prot. Transl Cont. Tumoral (p23) | 114 | A4573 | Sobre |
| P31930 | UQCR1; Prot. I do complex. Ubiquinol-cytc Reductasa, Perc. mit. | 333 | A4573 | Sobre |
| P18206 | Vinculina; isoforma splice 1 y 2 | 208 + 205 | A673 | Sobre |

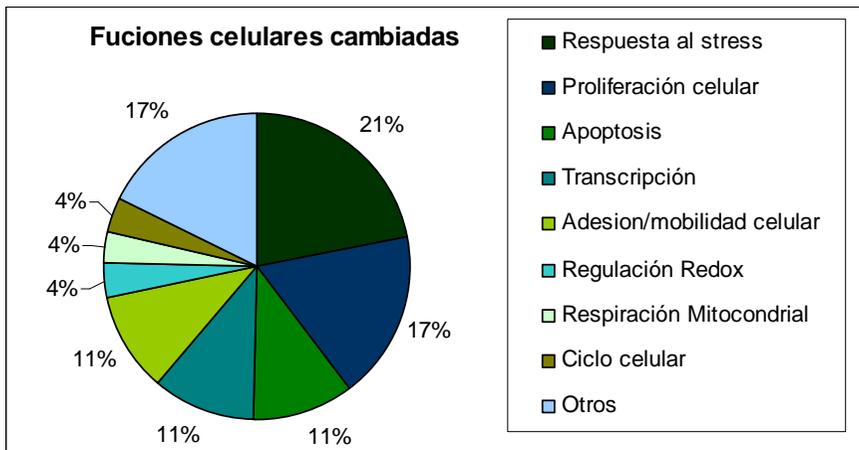


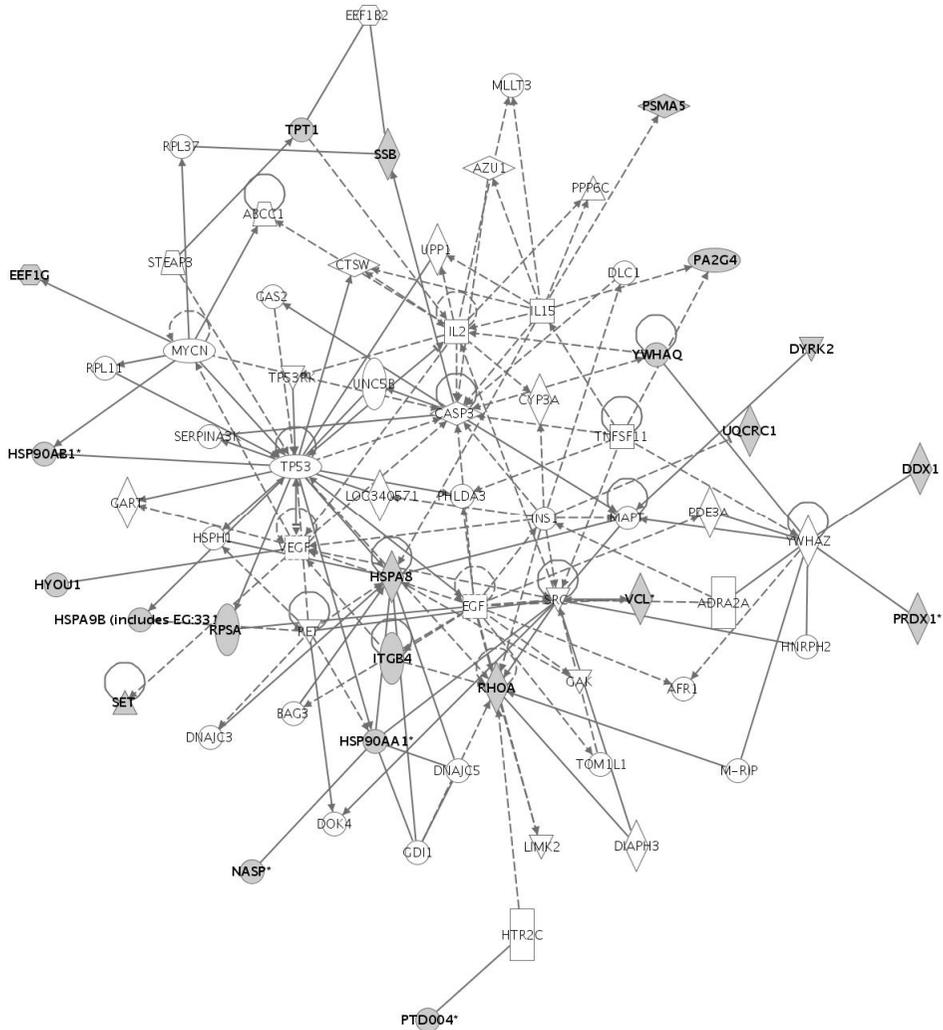
Figura 40: Función de las proteínas que presentaron cambios de expresión tras tratamiento con ADW y/o IMA. El mayor grupo es el de las proteínas involucradas en la respuesta al stress (21%) y la apoptosis (17%).

Con los datos obtenidos se hizo un análisis de interacción de rutas de señalización con el software *Ingenuity*, para poder detectar las rutas/redes de señalización más importantes alteradas con el tratamiento.

Se verificó que existían muchas rutas alteradas y que HSP90, Set, RhoA, PRDX1, VCL, EEF1G, entre otras (las proteínas marcadas en gris en la Figura 41) eran algunas de las proteínas que aparecían conectando ciertas rutas.

A partir de estos resultados, se seleccionó un panel menor de proteínas (las que aparecen marcadas con * en la Tabla 11) para comprobar los resultados a nivel de ARNm y proteína.

Merge Network 2



©2000–2006 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Resultados

Figura 41: Análisis de los resultados obtenidos con el Software *Ingenuity Pathway Analysis*. Rutas de señalización de las líneas celulares tratadas con ADW y/o IMA. Las líneas representan las interacciones funcionales y físicas descritas en la literatura. Los símbolos de las proteínas que no están en gris indican proteínas encontradas en la red proteica pero que no se encuentran alteradas.

4.5 Identificación de nuevas posibles dianas terapéuticas a partir de los estudios de Proteómica, y comprobación con estudios moleculares;

En este apartado se realizaron estudios de qRT-PCR y *Western Blotting* para evaluar la expresión a nivel del ARNm y proteína de las proteínas seleccionadas en el punto anterior.

Con estos estudios se demostró que casi todas las proteínas elegidas estaban realmente alteradas, tanto a nivel de ARNm como de expresión proteica, y que los resultados no se debían prácticamente a la inespecificidad del *background* celular, propio de cada línea celular.

Se han obtenidos diferencias significativas entre los estudios a las 24 y 72 horas de tratamiento, demostrando principalmente una activación inicial de la respuesta al stress a las 24 horas de tratamiento y obteniéndose efectos más consistentes y línea celular/fármaco-específicos a las 72 horas. Se han verificado diferencias significativas entre las dos líneas celulares estudiadas (Figura 42, Figura 43 y Figura 44).

Globalmente se observó que el mono-tratamiento (ADW ó IMA) tenía efectos similares y que era menos efectivo que la combinación (ADW+IMA). Las proteínas sobre-expresadas estaban relacionadas con la apoptosis y las sub-expresadas estaban relacionadas con la proliferación y respuesta al stress.

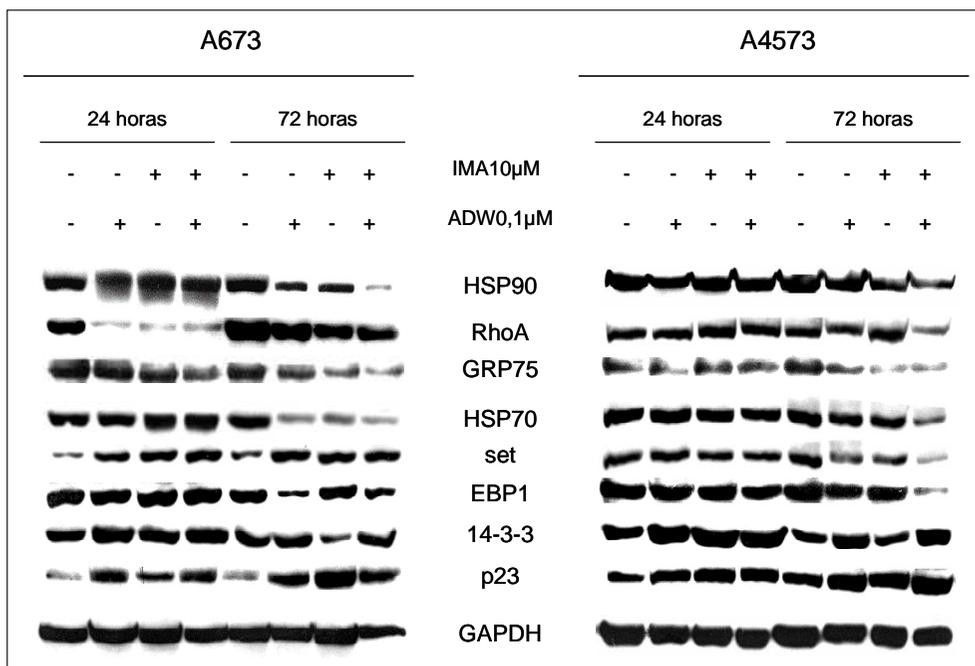


Figura 42: Estudios de *Western Blotting* de las proteínas elegidas en los estudios de proteómica de las líneas A673 y a4573 tratadas con ADW y/o IMA, a las 24 y 72 horas. La expresión de HSP90, RhoA, GRP75, HSP70, set, EBP1, 14-3-3 y p23 cambiaron con el tratamiento, dependiendo estos efectos del tiempo de incubación y de la línea celular tratada. La expresión de HSP90/70 expresión cambió en ambas líneas celulares a las 72 horas de tratamiento, lo que indicó una respuesta celular generalizada de las líneas de SE.

Visto que uno de los procesos celulares más cambiados con el tratamiento con ADW y/o IMA era la respuesta al stress, y puesto que había disponibles inhibidores específicos de HSP90, estando ya caracterizada su función en el cáncer, se decidió estudiar el papel de HSP90 en la respuesta al stress de las líneas de SE.

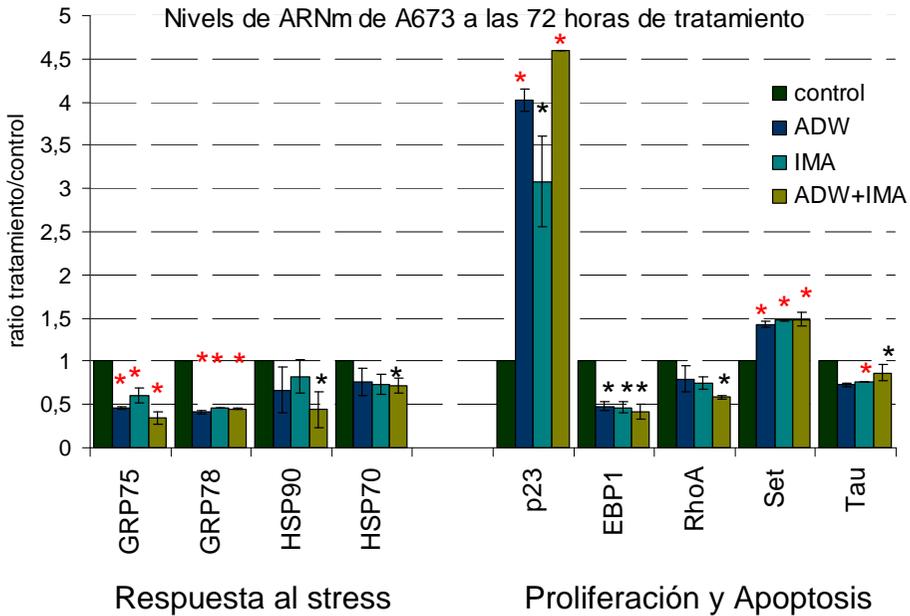
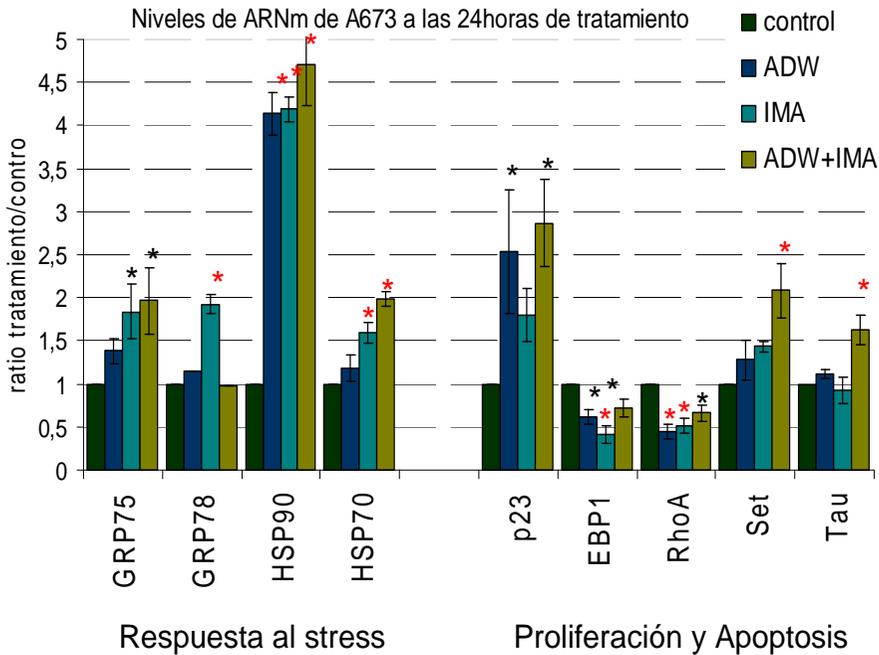


Figura 43: Niveles del ARNm de las proteínas seleccionadas en los estudios de proteómica de la línea A673 tratada a las 24 y 72 horas con ADW y/o IMA. El mono-tratamiento fue menos efectivo que la combinación. *: $p < 0.05$ y *: $p < 0.001$, determinados con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes. Los datos representan la media de experimentos por triplicado.

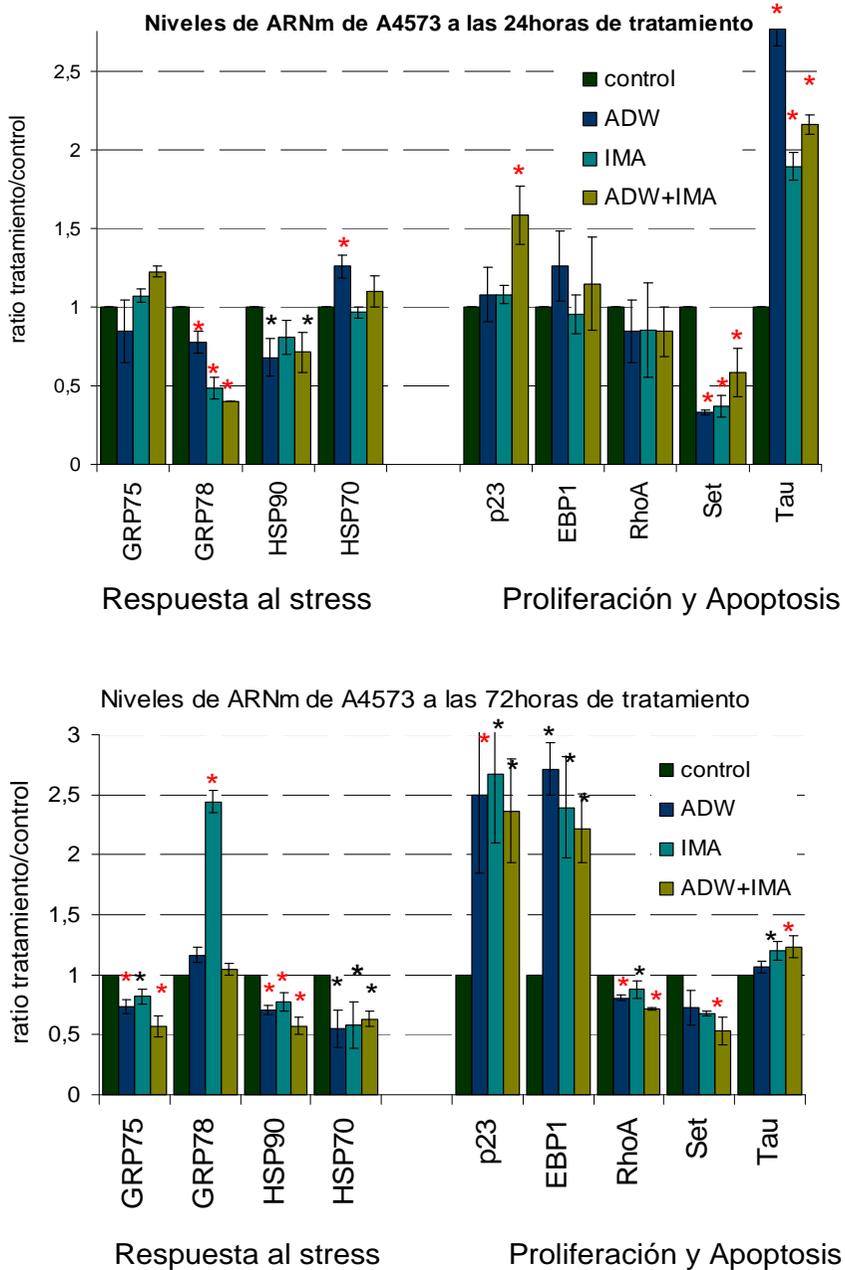


Figura 44: Niveles del ARNm de las proteínas seleccionadas en los estudios de proteómica de la línea A673 tratada a las 24 y 72 horas con ADW y/o IMA. El monotratamiento fue menos efectivo que la combinación. Las proteínas sobre-expresadas estaban relacionadas con la apoptosis y las sub-expresadas estaban relacionadas con la proliferación y respuesta al stress. *: $p < 0.05$ y *: $p < 0.001$, determinados con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes. Los datos representan la media de experimentos por triplicado.

4.6 Estudio de la implicación de HSP90 en Sarcoma de Ewing

Inicialmente se empezó por probar los efectos del fármaco Geldanamicina (que es un inhibidor específico de HSP90) en un panel de 5 líneas de SE con diferentes tipos de fusión EWS-ETS (las 4 ya caracterizadas anteriormente y una adicional, la línea TTC466 que tiene una fusión EWS-ERG). Sin embargo, como los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, se decidió probar su derivado, el 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), que fue bastante más específico y menos tóxico, por lo que se pasan a presentar únicamente los resultados de la inhibición de HSP90 usando este fármaco.

4.6.1 Expresión de HSP90 en líneas celulares de Sarcoma de Ewing

Se empezó por comprobar los cambios de expresión de HSP90 en el panel de 5 líneas celulares de SE, en condiciones control y tras tratamiento con ADW y/o IMA, durante 24 ó 72 horas.

Se verificó que la expresión de HSP90 cambiaba en todas las líneas celulares, dependiendo los efectos de la línea en cuestión. De un modo global, a las 24 horas de tratamiento, la expresión de HSP90 tuvo un incremento en las líneas A673 y TTC466 y una disminución en las demás líneas. A las 72 horas, la expresión de HSP90 se disminuyó en todas las líneas celulares, especialmente en el caso de A673.

Después de confirmar los cambios de expresión de HSP90 en las líneas de SE, se procedió a estudiar su papel en la proliferación y apoptosis de las mismas líneas celulares, inhibiendo específicamente su función al tratar las líneas celulares con 17-AAG.

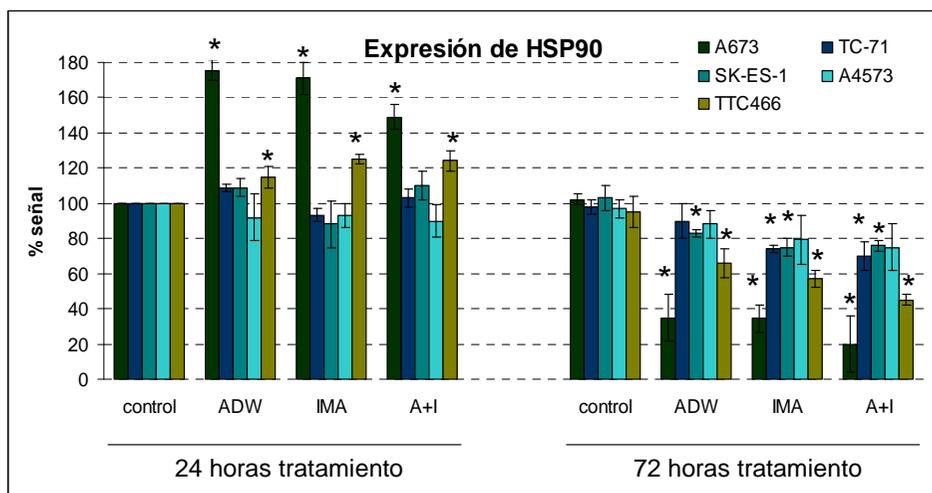


Figura 45: Análisis densitométrico del estudio por WB de los efectos del tratamiento con ADW y /ó IMA en los niveles de HSP90. La expresión de HSP90 se incrementó a las 24 horas en las líneas A673 y TTC466 y se disminuyó en las demás líneas. A las 72 horas la expresión de HSP90 se disminuyó en todas las líneas celulares, especialmente en A673. *: $p < 0,05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes.

4.6.2 Efectos de la inhibición de HSP90 con 17-AAG

4.6.2.1 Efectos en la proliferación

Todas las líneas celulares han tenido respuestas similares con la inhibición de HSP90, obteniéndose una inhibición de la proliferación de un modo dosis-dependiente, a las 24 y 72 horas de tratamiento (Figura 46).

Tabla 12: IC_{50} de proliferación (μM) de las líneas de SE tratadas a las 24 y 72 horas con 17-AAG.

| Líneas celulares | 24 horas | 72horas |
|------------------|---------------|---------------|
| A673 | 1,33 +/- 0,17 | 0,57 +/- 0,05 |
| TC-71 | 1,12 +/- 0,08 | 0,49 +/- 0,06 |
| SK-ES-1 | 1,01 +/- 0,08 | 0,42 +/- 0,04 |
| A4573 | 1,24 +/- 0,11 | 0,45 +/- 0,04 |
| TTC466 | 1,62 +/- 0,1 | 0,72 +/- 0,06 |

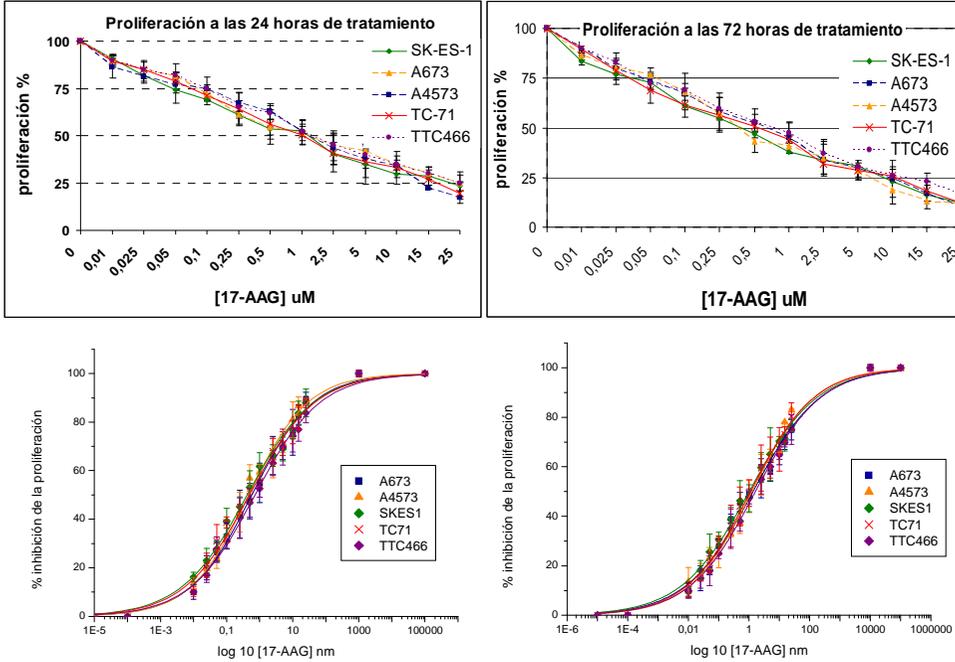


Figura 46: Efectos del tratamiento con 17-AAG en la proliferación de las líneas de SE, a las 24 y 72 horas de tratamiento. Todas las líneas han tenido resultados similares.

4.6.2.2 Efectos en la apoptosis

Con los estudios de apoptosis se decidió apenas estudiar los efectos del tratamiento con 17-AAG a las 72 horas, ya que se necesitaría menor cantidad de fármaco para lograr los mismos efectos y que, de esta manera, se analizarían apenas los efectos directos de la acción de la inhibición de HSP90 y no los efectos indirectos e inespecíficos de toxicidad.

Se verificó que los efectos del tratamiento con 17-AAG en la inducción de la apoptosis de las líneas de SE dependían específicamente de cada línea en cuestión. La inducción de apoptosis varió entre el 20-30% en las líneas TTC466 y A673 y el 8-20% en las demás líneas celulares, con un impacto más acentuado en los niveles de apoptosis tardía/necrosis que en los de apoptosis temprana.

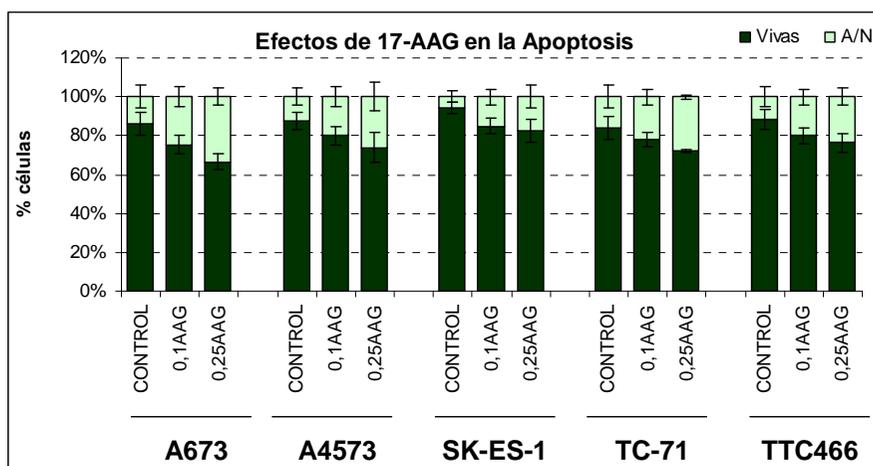


Figura 47: Efectos de 17-AAG en la apoptosis de las líneas de SE. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los estudios de citometría. Se obtuvo un mayor impacto en los niveles de apoptosis tardía/necrosis que los de apoptosis temprana y la línea más afectada fue A673.

4.6.2.3 Efectos en la expresión de las proteínas cliente de HSP90

Los resultados obtenidos se han podido explicar, por lo menos parcialmente, cuando se analizaron los niveles de expresión de algunas proteínas cliente de HSP90 tras tratamiento con 17-AAG, en las líneas A673 y A4573 (las líneas de SE que resultaron tener comportamientos más distintos a nivel de sensibilidad a los tratamientos con ADW y/o IMA).

Se observó que 17-AAG inhibía la expresión de IGF1R, c-kit y AKT y que, como consecuencia de esto, se obtenía también una disminución de los niveles de fosforilación de AKT, m-TOR y MAPK42/44. Estos resultados fueron más evidentes en la línea A673 que en la A4573, en la cual no se detectó una degradación significativa de IGF1R ó c-kit.

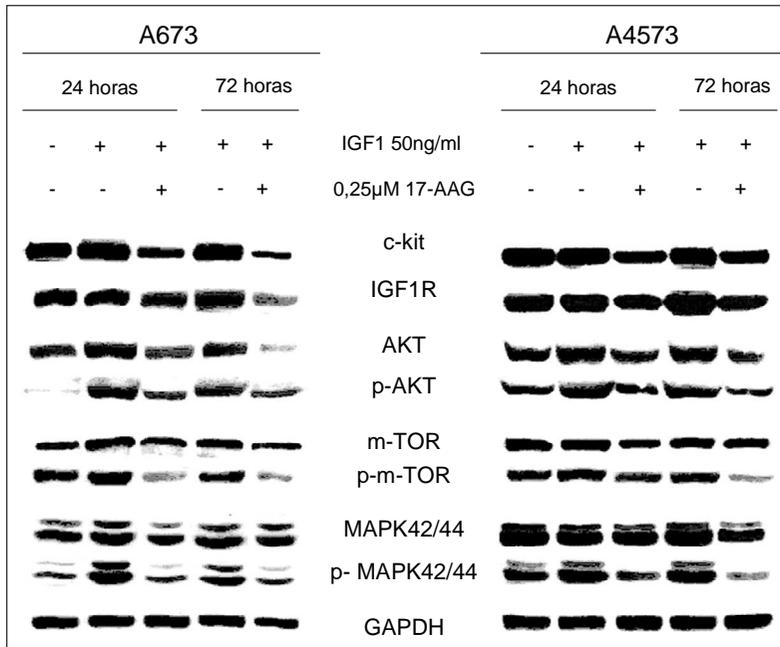
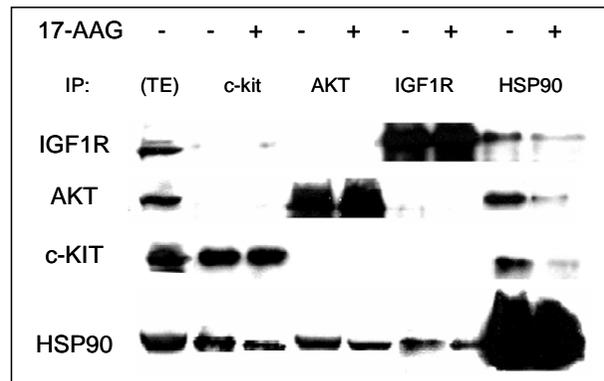


Figura 48: Efectos de 17-AAG en la expresión y fosforilación de algunas proteínas cliente de HSP90, de las líneas A673 y A4573 tratadas a las 24 y 72 horas. El tratamiento con 17AAG resulto en una degradación de IGF1R, c-kit y AKT, siendo la línea A673 más sensible a este tipo de tratamiento.

Posteriormente se hicieron estudios de inmunoprecipitación contra HSP90 para estudiar la interacción física entre HSP90 y sus proteínas cliente.

Como se puede verificar en la Figura 49, todas las proteínas estudiadas se encontraban en el extracto total (TE; primera banda de la izquierda) y c-KIT, AKT e IGF1R eran coimmunoprecipitadas con HSP90 (octava banda de la izquierda). El tratamiento con 17-AAG ha reducido la interacción de IGF1R, AKT y c-KIT con HSP90 (novena banda). De nuevo, la interacción entre HSP90 y KIT ó IGF1R fue bastante más débil en las líneas sensibles a ADW/IMA (A4573, SK-ES-1 y TC-71) que en las resistentes (A673 y TTC466) (se presenta el estudio densitométrico de la línea A4573 como ejemplo del grupo de líneas sensibles a ADW/IMA. Las líneas SK-ES-1 y TC-71 han presentado resultados similares).

A)



B)

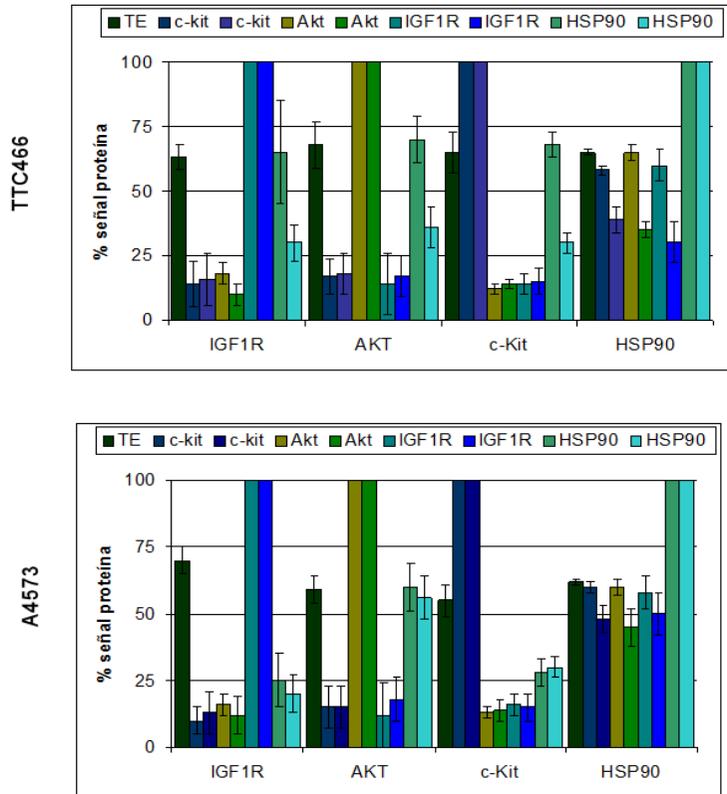


Figura 49: Efectos del tratamiento con 17-AAG en la interacción física de HSP90 y algunas de sus proteínas cliente. A) WB obtenido para la línea A673. Todas las proteínas estudiadas se encontraban en el extracto total (TE; primera banda de la izquierda) y c-KIT, AKT e IGF1R eran coimmunoprecipitadas con HSP90 (octava banda de la izquierda). El tratamiento con 17-AAG redujo la interacción de IGF1R, AKT y c-KIT con HSP90 (novena banda). B) Análisis densitométrico de los WB de las líneas A4573 y TTC466. La interacción física de IGF1R, AKT y c-KIT con HSP90 ha sido reducida con el tratamiento con 17-AAG. La interacción de HSP90 con sus proteínas cliente fue más débil en la línea A4573.

Resultados

4.7 Estudio de los efectos de la combinación de la inhibición de HSP90 con la de IGF1R ó c-kit en SE.

4.7.1 Modelos in Vitro

Como se verificó que el tratamiento con 17-AAG era eficaz en las líneas A673 y TTC466 (que habían resultado ser las más insensibles a ADW/IMA) y que reducía p-AKT, p-m-TOR y p-MAPK, se decidió estudiar la combinación de este fármaco con ADW ó IMA, a nivel de la proliferación y apoptosis de las líneas de SE.

4.7.1.1 Efectos en la proliferación

Se observó que la combinación de 17-AAG con ADW/IMA resultó en un descenso adicional de la proliferación del orden del 15-50%, dependiendo de la sensibilidad de cada línea celular (Figura 50). La combinación de 17-AAG con ADW fue sinérgica en casi todas las líneas celulares (se obtuvo un rango de IC del 0.35-0,9). En el caso de la combinación con IMA, se han observado efectos sinérgicos en las líneas A673 y TTC466 (en la línea A673 el rango de IC fue de 0,53-0,8 y en el de la línea TTC466 fue de 0,44-0,796).

4.7.1.2 Efectos en la apoptosis

En los estudios de la apoptosis se detectó una inducción dosis-dependiente de la apoptosis tras tratamiento con ADW/IMA. El efecto de combinar 17-AAG con ADW ó IMA resultó en un incremento adicional del 10-50% en la apoptosis, dependiendo de la línea celular. Se observó principalmente efectos aditivos pero, de nuevo, se detectó sinergia (IC de 0,5-0,7) en el caso de las líneas A673 y TTC466, alcanzándose niveles de apenas un 25% de supervivencia.

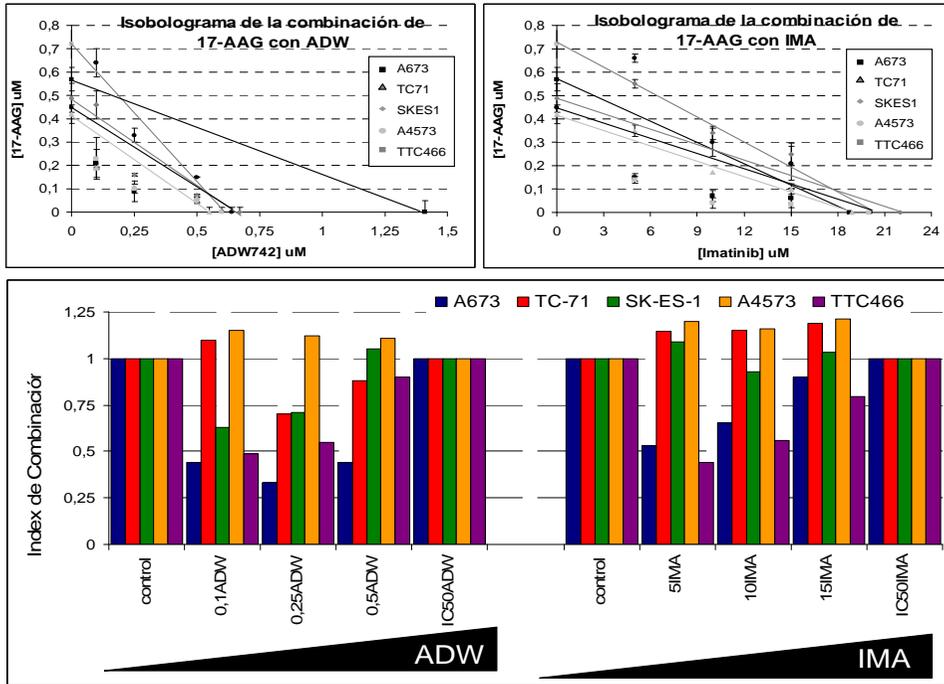


Figura 50: Efectos antiproliferativos de 17-AAG combinado con ADW/IMA en las líneas de SE. A) Isobologramas de las combinaciones. Las líneas representan la zona de aditividad. B) los correspondientes indexes de combinación. La combinación resultó en un descenso adicional de la proliferación en un 15-50%.

Resultados

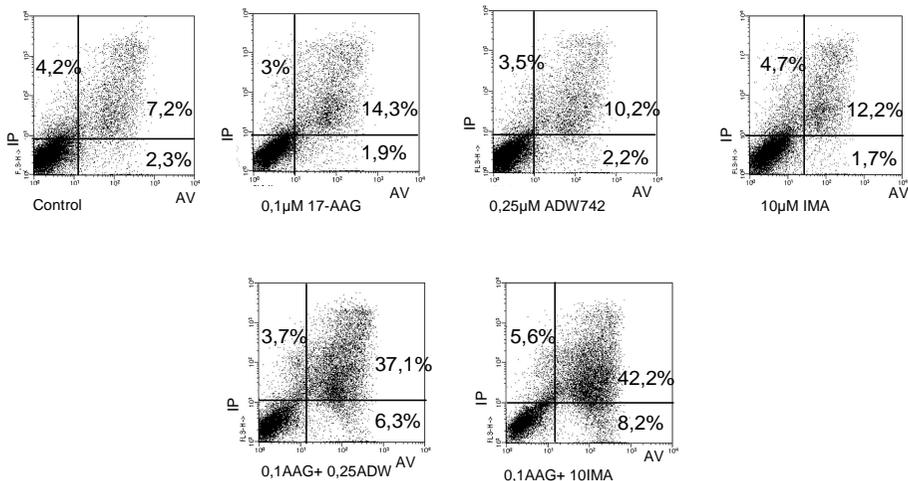


Figura 51: Efectos de la combinación de 17-AAG con ADW/IMA en la apoptosis de la línea A673. Histograma de algunas condiciones del tratamiento. Mientras que con el montratamiento no se indujo la apoptosis, con las combinaciones si se obtuvo inducción de apoptosis.

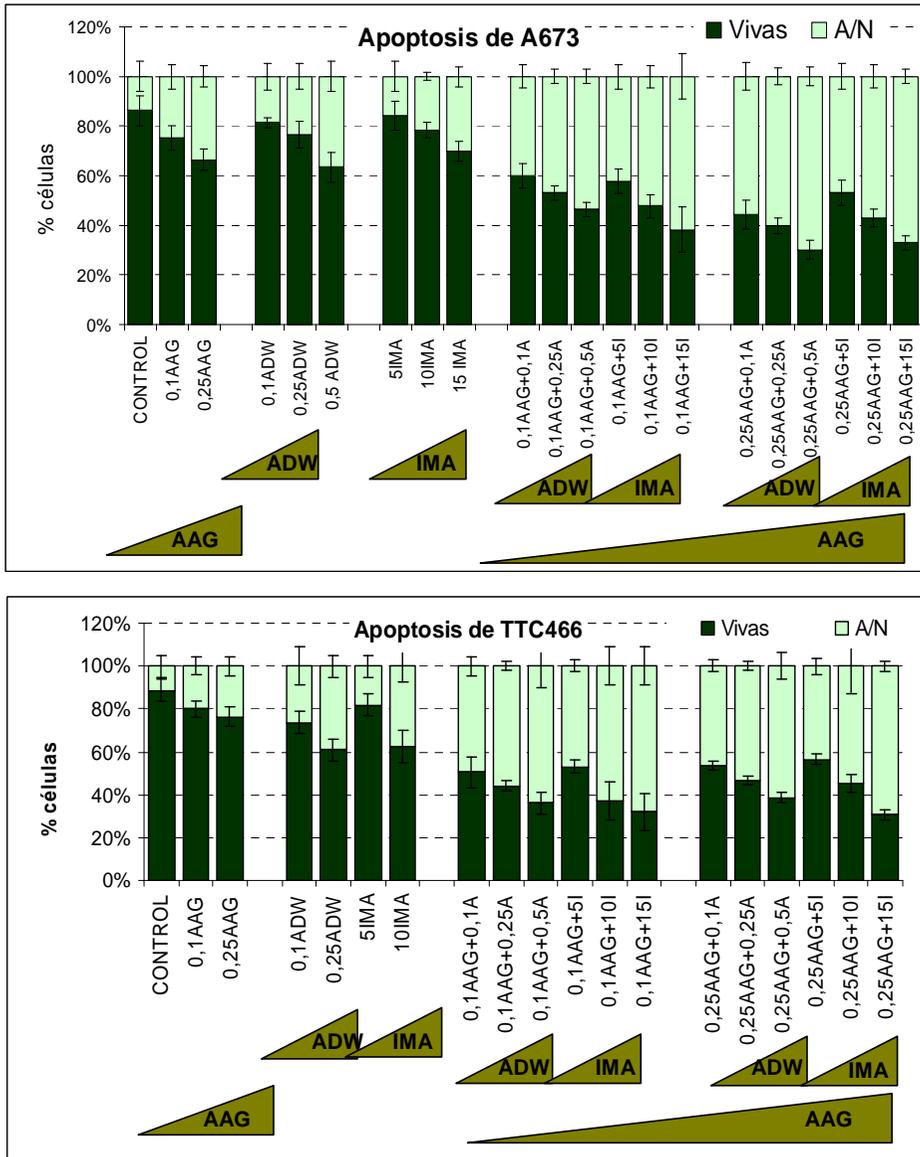


Figura 52: Efectos de la combinación de 17-AAG con ADW/IMA en la apoptosis de las líneas A673 y TTC466. Representación grafica de todas las condiciones del tratamiento. Cuanto mas elevada fue la concentración de los fármacos usados, mayor el ratio entre células apoptóticas/necróticas y células vivas, indicando un incremento de la inducción de la muerte celular. Se han observado efectos sinérgicos en el caso de las combinaciones en la línea A673. A/N: apoptosis/necrosis; A: ADW y I: IMA.

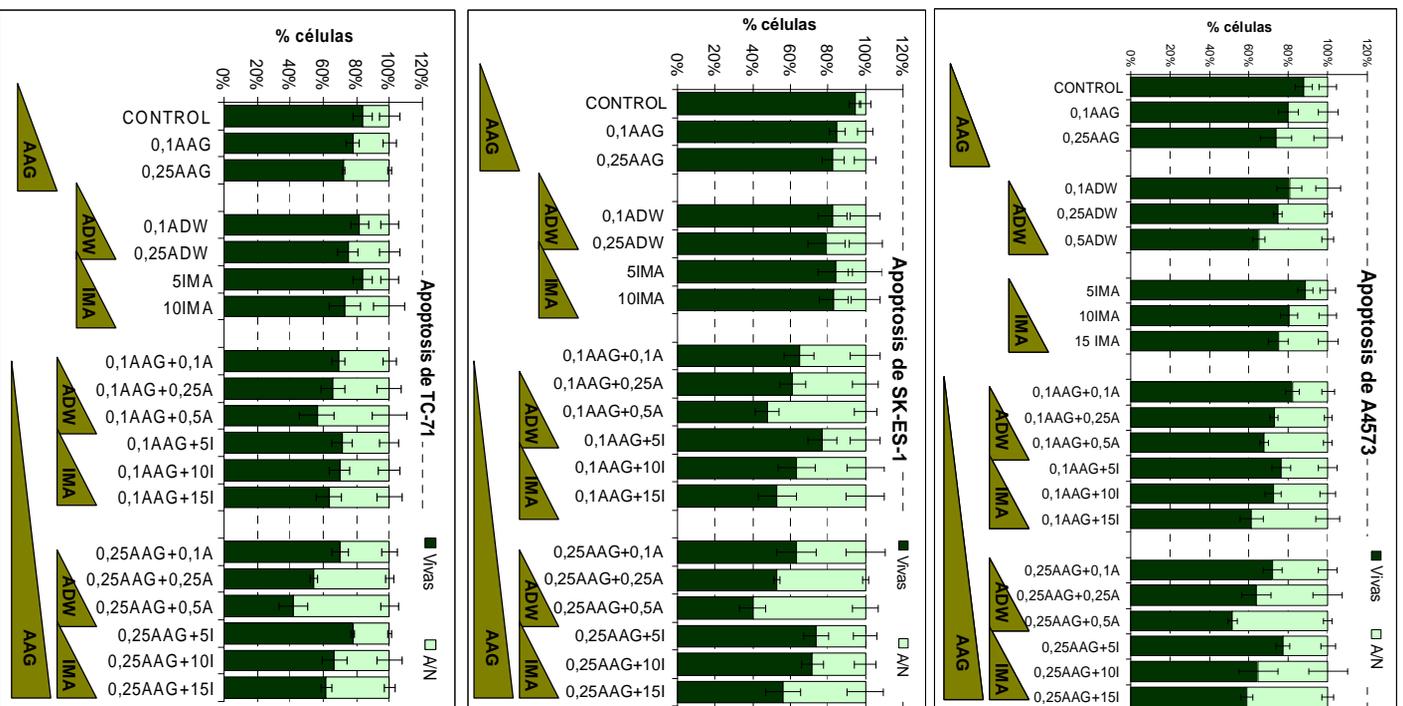


Figura 53: Efectos de la combinación de 17-AAG con ADW/IMA en la apoptosis de las líneas A4573, SK-ES-1 y TTC466. Se han observado efectos aditivos de la combinación 17AAG+ADW/IMA en todas las líneas celulares. A/N: apoptosis/necrosis; A: ADW y I: IMA.

4.7.1.3 Estudios adicionales con el HSP90-siARN y la sobre-expresión de HSP90

Para comprobar que los resultados obtenidos con 17-AAG se debían al bloqueo específico de HSP90, se decidió hacer dos estudios adicionales. Uno de los estudios se basó en la técnica de la interferencia de ARN (en el cual se ha reducido la expresión de HSP90 en las líneas celulares resistentes a ADW/IMA) y el otro en el que se indujo la sobre-expresión de HSP90 (en las líneas sensibles a ADW/IMA) para probar que la alta expresión de HSP90 confería resistencia a tratamiento con ADW ó IMA.

4.7.1.3.1 Estudios con el HSP90-siARN

Inicialmente se hizo un estudio preliminar en el cual se estudiaron la mejor manera de transfectar las líneas de SE (en este caso A673 y TTC466) y la concentración óptima del siARN. Así, se verificó que se tenían de transfectar los siARN mediante el método de electroporación, con una concentración 75nM. De este modo se obtuvo una reducción de la expresión de HSP90 en un 35-65%, sin que el método de transfección cambiara la expresión de esa proteína (el control negativo del siARN no indujo ningún cambio de expresión, como se puede ver en la Figura 54).

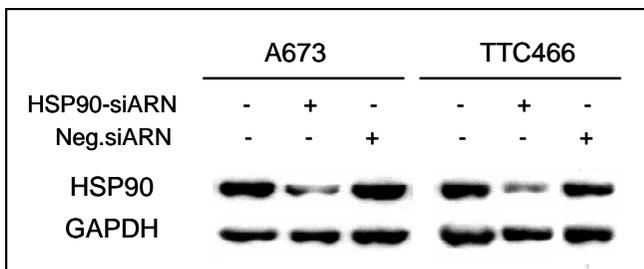


Figura 54: Efectos del HSP90-siARN en la expresión de HSP90 de las líneas A673 y TTC466. El HSP90-siARN ha reducido la expresión de HSP90 un 35-65% mientras que el neg.-siARN no tuvo efecto alguno.

Tal y como se sospechaba, el HSP90-siARN mejoró los efectos del tratamiento con ADW ó IMA en la inhibición de proliferación e inducción de apoptosis, siendo los resultados muy similares a los obtenidos con 17-AAG (Figura 55 y Figura 56). Se observó un descenso del 20-30% en la proliferación y un 15-40% en la inducción de apoptosis de las células tratadas con el HSP90-siARN (cuando comparadas con las situaciones control de no-tratamiento ó neg.-siARN).

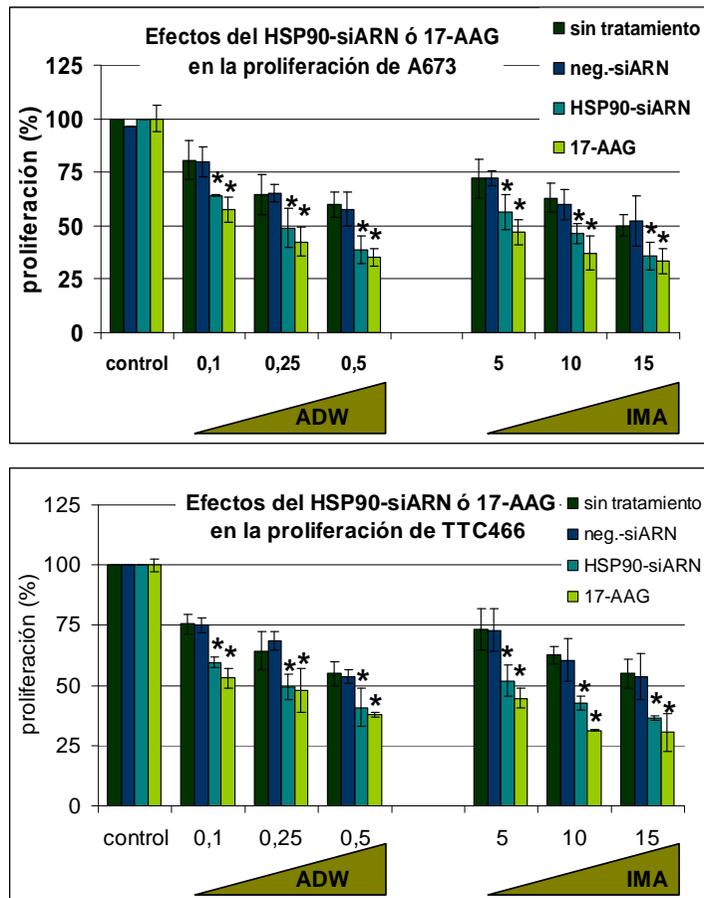


Figura 55: Efectos antiproliferativos del bloqueo de la expresión de HSP90 con HSP90-siARN combinado con ADW/IMA, en las líneas A673 y TTC466, tratadas durante 72 horas. Los resultados obtenidos con el HSP90-siARN fueron muy similares a los del tratamiento con 17-AAG, con una disminución de la proliferación del orden del 20-30%. *: $p < 0,05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes.

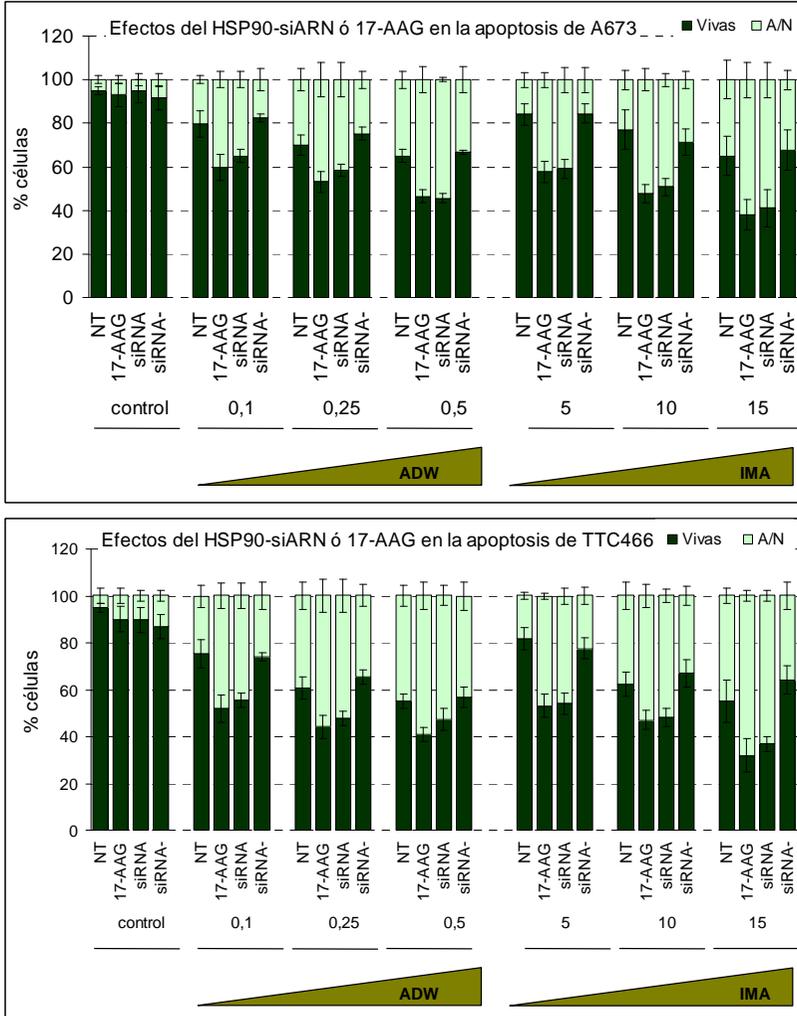


Figura 56: Efectos del bloqueo de la expresión de HSP90 con HSP90-siARN combinado con ADW/IMA, en la apoptosis de las líneas A673 y TTC466, tratadas durante 72 horas. Se obtuvo una inducción de los niveles de apoptosis del 15-40%. ST: sin tratamiento. A/N: apoptosis/necrosis.

Estos resultados confirmaron que los resultados obtenidos con 17-AAG eran específicos de la inhibición de HSP90 y no debidos a efectos alternativos/inespecíficos de este fármaco. Con estos resultados también se confirmó la hipótesis de que los niveles de expresión de HSP90 son determinantes para la respuesta de las células de SE al tratamiento con ADW/IMA.

4.7.1.3.2 Estudios con la sobreexpresión de HSP90

La hipótesis propuesta anteriormente fue igualmente comprobada en estos estudios, aunque por una aproximación opuesta, ya que en este caso se estudiaron los efectos de la sobre-expresión de HSP90.

Como anteriormente, se hizo un estudio preliminar en el cual se optimizaron las condiciones de transfección del vector con el gen de HSP90 (clonHSP90) en el cual se obtuvo una sobre-expresión de HSP90 del 30-73% en las líneas A4573, SK-ES-1 y TTC466 (Figura 57).

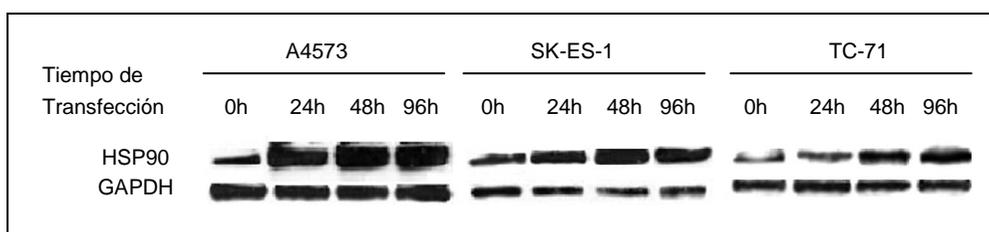


Figura 57: Efectos de la transfección del clon de HSP90 en la expresión de HSP90 de las líneas A4573, SK-ES1 y TTC466. El clon de HSP90 (15µg) indujo eficazmente una sobre-expresión de HSP90, especialmente en la línea A4573.

Como se puede verificar en las Figura 58 y Figura 59, la sobre-expresión de HSP90 indujo un incremento en los niveles de proliferación de las líneas de SE, confiriéndoles resistencia a los efectos proapoptóticos de ADW/IMA. La inducción de apoptosis fue drásticamente bloqueada (no se obtuvo más del 20% de inducción de apoptosis en las condiciones bajo tratamiento, valores próximos a la situación control). Todas las condiciones tuvieron valores de más del 75%, más elevados que en las condiciones no-transfectadas. Estos resultados no se han debido, apenas, a efectos de la transfección ya que se verificó que el *mock* (vector vacío) no afectó ni la proliferación ni la apoptosis de las líneas estudiadas.

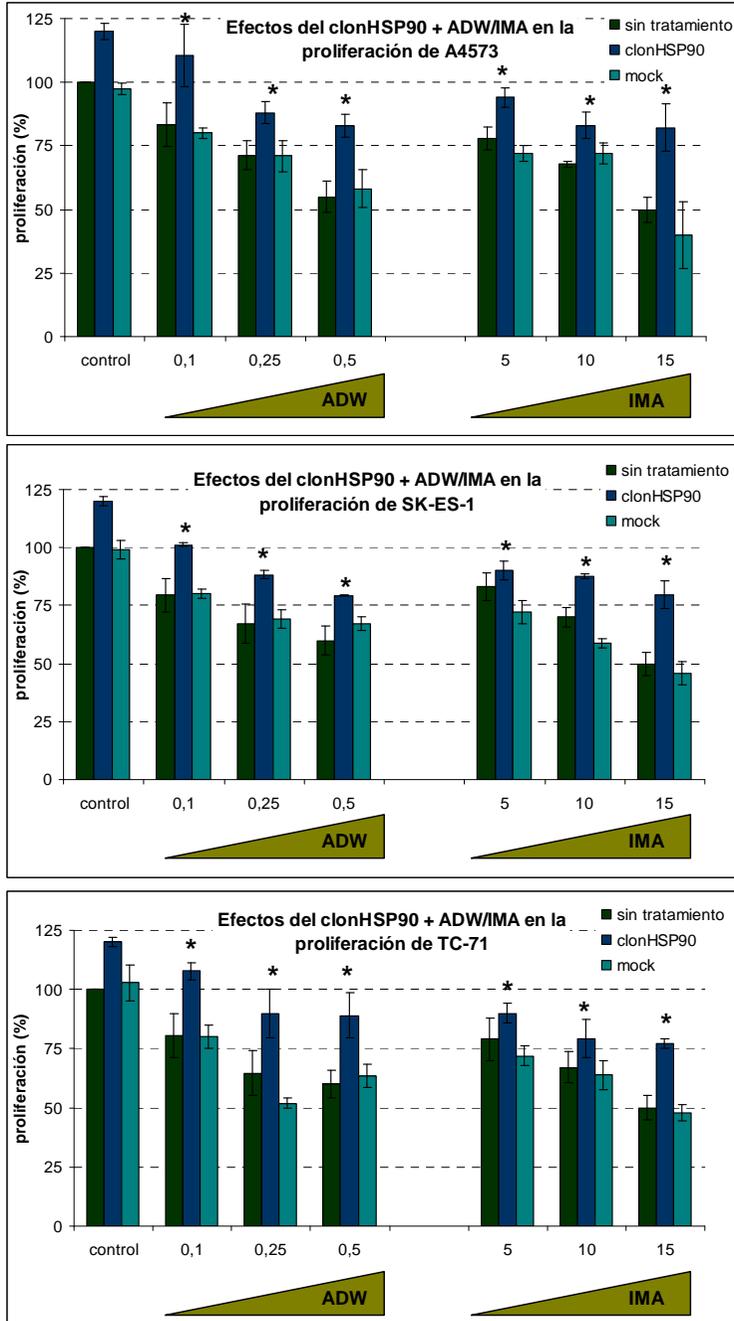


Figura 58: Efectos de la combinación del clonHSP90 con ADW/IMA a nivel de la proliferación de las líneas A4573, SK-ES-1 y TC-71, tratadas durante 72 horas. La sobre-expresión de HSP90 indujo un incremento de la proliferación, obteniéndose valores por encima del 75%, incluso tras el tratamiento con ADW/IMA. *: $p < 0.05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes.

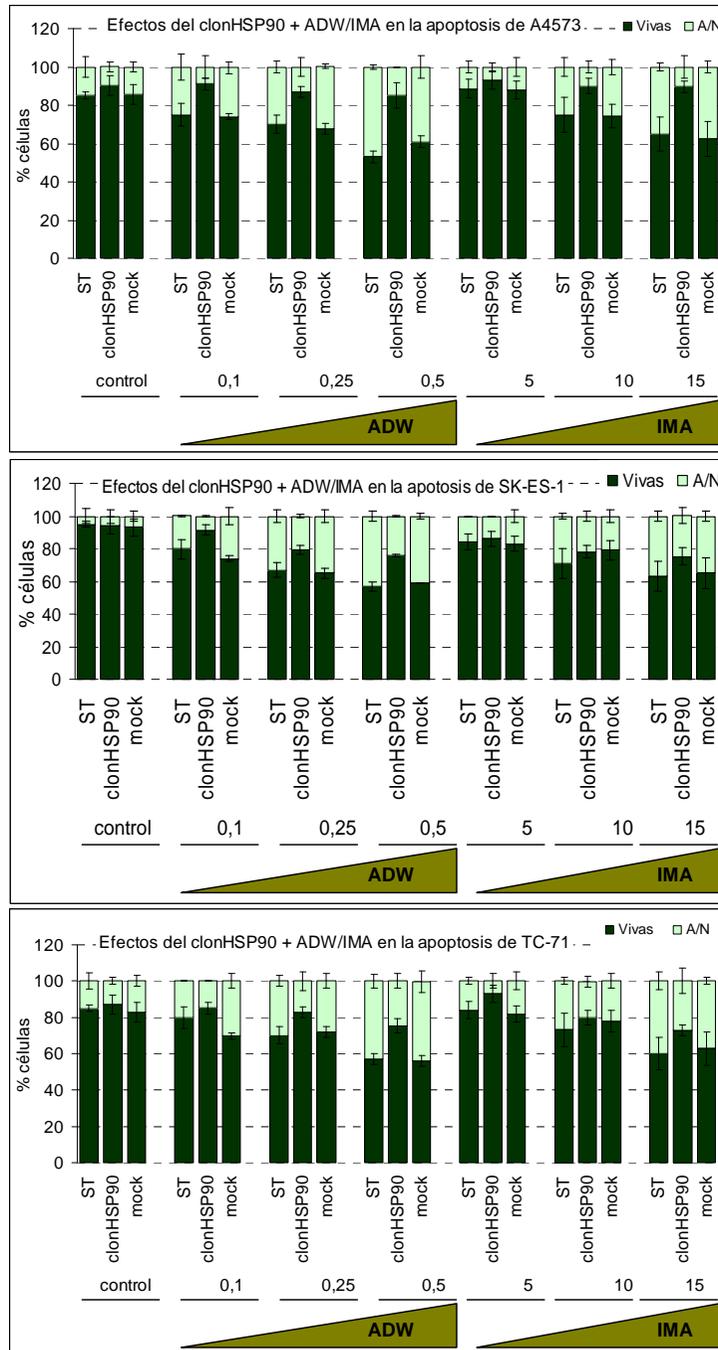


Figura 59: Efectos de la combinación del clonHSP90 con ADW/IMA, a nivel de la apoptosis de las líneas A4573, SK-ES-1 y TC-71, tratadas durante 72 horas. La sobre-expresión de HSP90 ha conferido resistencia a la inducción de apoptosis, bloqueándola casi totalmente. No se obtuvo más de un 20% de inducción de apoptosis, valores muy similares a la situación control.

Resultados

4.7.2. Modelos animales

Después de comprobar *in vitro* los efectos del tratamiento con 17-AAG, solo ó combinado con ADW/IMA, se decidió hacer un estudio *in vivo* en el que se pretendió valorar la eficacia antitumoral del tratamiento con 17-AAG, solo ó combinado con AEW541 (análogo del ADW, que tiene el mismo mecanismo de acción pero que es más específico para IGF1R y menos tóxico (387)) en ratones NOD/scid implantados con células de Sarcoma de Ewing.

Este estudio confirmó los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*. Mientras que en la parte final del estudio, en la situación control, se detectó un aumento del tamaño medio tumoral del 340% y en el grupo tratado con AEW de 270%, este aumento fue de apenas un 74% en el grupo tratado con 17AAG y de un -38% en el grupo de la combinación.

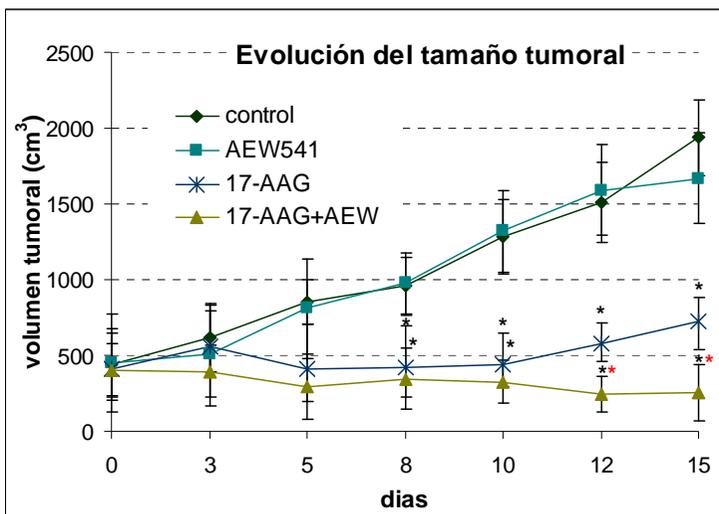


Figura 60: Estudios *in vivo* del tratamiento con 17-AAG, solo ó en combinación con el AEW. Los tumores del grupo control han tenido un aumento del 340% y los del grupo tratado con AEW tuvieron un aumento del 270%. Los ratones del grupo tratado con 17AAG solamente tuvieron un aumento del 72% y los del grupo de la combinación 17-AAG+AEW -38%. Los animales tratados con 17AAG presentaron un retraso del crecimiento tumoral mientras que los de la combinación tuvieron una reducción del tamaño tumoral. *: $p < 0.05$, determinado con el análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes. *:17-AAG solo ó 17-AAG+AEW vs control; **:17-AAG+AEW vs 17-AAG solo.

Los animales tratados con el monoterapia de AEW tuvieron un comportamiento similar a los del grupo control, mientras que los animales tratados con 17AAG tuvieron un retraso en el crecimiento tumoral durante las dos semanas de tratamiento. En el caso de los animales del grupo tratado con la combinación de 17-AAG+AEW, estos tuvieron no tan solo un retraso del crecimiento tumoral, sino también una marcada reducción del tamaño medio tumoral, aproximadamente del 40%. El efecto de la combinación fue incluso más marcado en aquellos animales que tenían inicialmente tumores más bajos del tamaño medio, en los cuales la reducción llegó a ser del 66%.

Los estudios histopatológicos hechos con las muestras tumorales demostraron que los tumores tratados con la combinación no eran apenas más pequeños, pero si tenían zonas más extensas de necrosis, como se puede ver en la Figura 61. Se verificó que la expresión de IGF1R, AKT y c-c-KIT estaba disminuida en los tumores tratados con 17-AAG, AEW y 17-AAG+AEW, respecto a las muestras del grupo control, lo que está de acuerdo con el hecho de que son proteínas cliente de HSP90. Por lo contrario, la expresión de m-TOR no cambió significativamente con el tratamiento (excepto en el caso del tratamiento con AEW) (Figura 62).

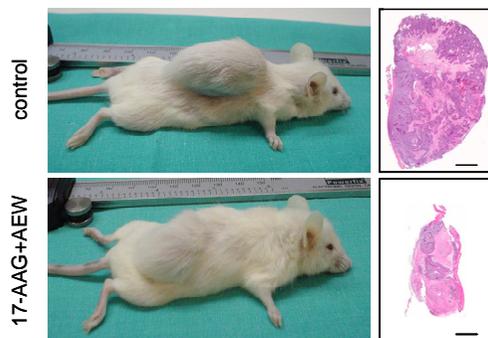


Figura 61: Evaluación visual y morfológica de los tumores animales. Las secciones teñidas con H&E de los tumores de los animales tratados con 17AAG+AEW (panel inferior) señalaban un marcado aumento del área neurotizado y una drástica reducción del tamaño, con respecto a los tumores del grupo control (panel superior). Barra: 1cm.

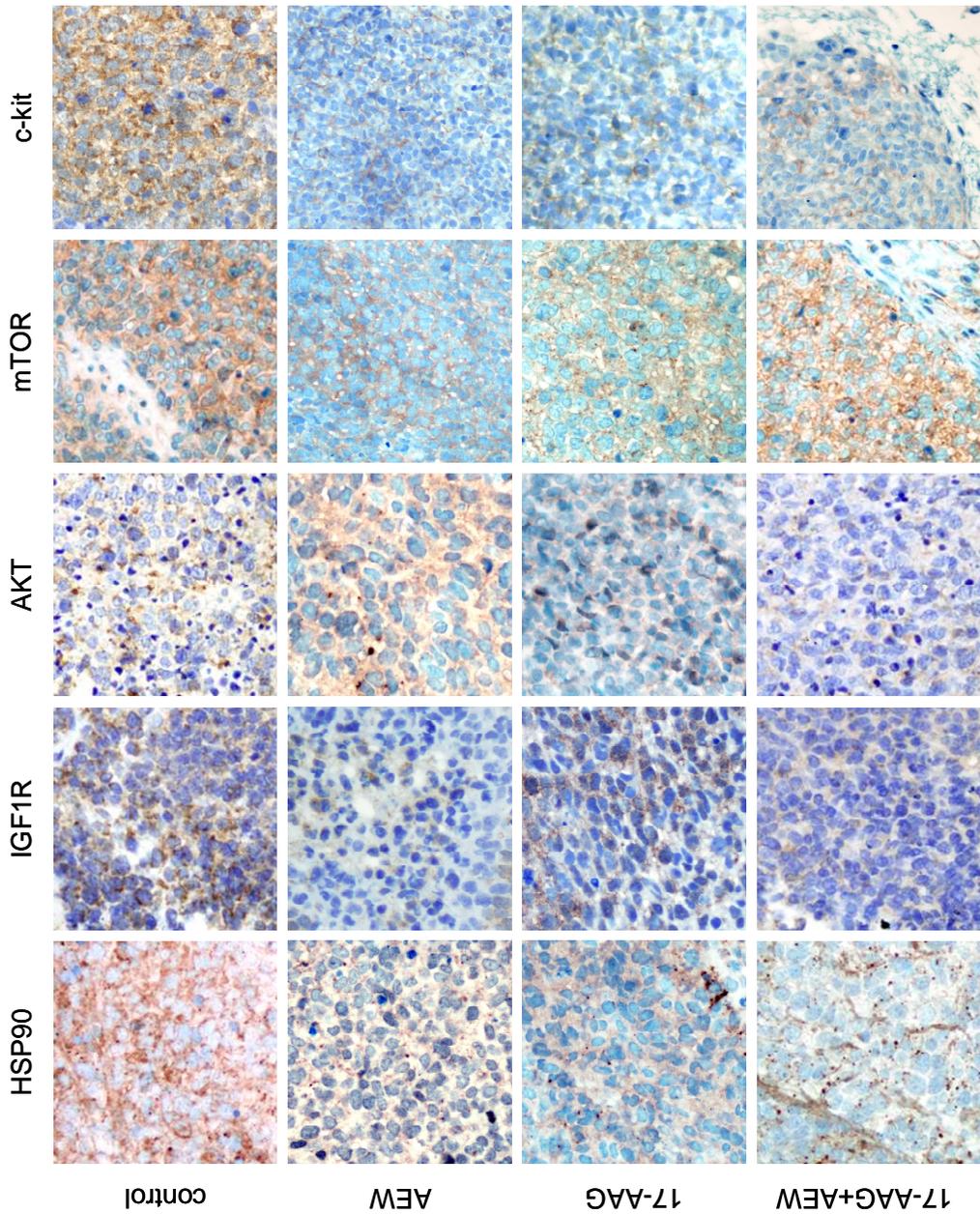


Figura 62: Evaluación ICQ de los niveles de la expresión de HSP90, IGF1R, AKT, m-TOR y c-kit de los tumores animales tras tratamiento con 17-AAG y/o AEW, durante dos semanas. La expresión de IGF1R, c-kit y AKT fue casi totalmente eliminada en los animales tratados con 17-AAG+AEW, con respecto al grupo control. Sin embargo, la expresión de m-TOR no tuvo cambios significativos. (400x).

4.8 Comprobación de los resultados obtenidos en muestras clínicas de pacientes de SE

Con el objetivo de correlacionar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* e *in vivo* con la clínica de los pacientes de SE, se decidió terminar los estudios de esta tesis doctoral analizando los niveles de expresión de algunas proteínas clave en muestras de pacientes de SE. Así, se han analizado los niveles de expresión de IGF1R, c-kit, HSP90, AKT y m-TOR, por ICQ, y se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados de la evaluación ICQ de las muestras de pacientes de SE del panel de casos estudiados. * Proteínas analizadas en el TMA

| Proteína | Señal positiva | Señal negativa | No analizado |
|----------|----------------|----------------|--------------|
| IGF1R* | 37 (3 débil) | 17 | 8 |
| c-kit* | 27 (2 débil) | 27 | 8 |
| HSP90* | 22 | 32 | 8 |
| AKT | - | 11 | 1 |
| m-TOR | 4 (2 débil) | 7 | 1 |
| p-m-TOR | 3 (1 débil) | 5 | 4 |

En lo que se refiere a la expresión de IGF1R, se detectó un marcaje citoplasmático y relativamente uniforme en los tumores, en ambos grupos de muestras clínicas de SE (5/10, 50% - en el caso del grupo de muestras del Dr. Enrique de Álava (EAC) y 33/44, 75% - en el caso del TMA).

La expresión de c-kit fue membranar, teniéndose un marcaje heterogéneo en los tumores, con un 64% de positividad en los casos de EAC (7/11) y un 48% en el TMA (21/44).

En ambos casos la intensidad de la señal fue de moderada a intensa.

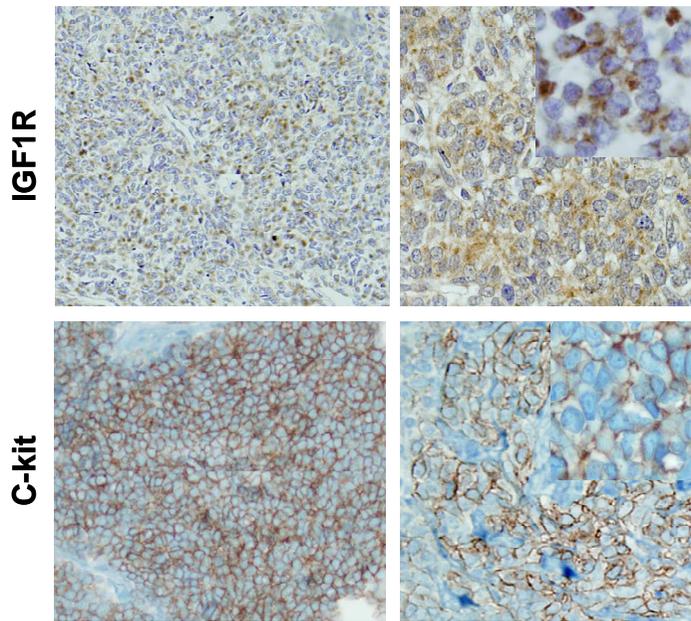


Figura 63: Evaluación ICQ de los niveles de expresión de IGF1R y c-kit. IGF1R tuvo un marcaje citoplasmático y uniforme en el tumor, 50% de casos positivos. c-kit tuvo reactividad membranar, heterogéneo, con un 64% de tumores positivos. La intensidad de la señal fue de moderada a intensa para ambas proteínas. Se presenta a la izquierda una imagen de vista intermedia (200x) y a la derecha una imagen de detalle (1000x).

En el caso de la expresión de m-TOR, se han detectado un 36% de casos positivos, con un marcaje citoplasmático y heterogéneo y con una intensidad de floja a moderada.

m-TOR

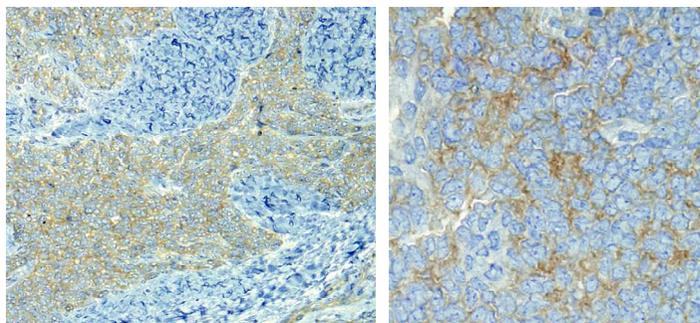


Figura 64: Evaluación ICQ de la expresión de m-TOR en las muestras clínicas de SE. La expresión de m-TOR fue citoplasmática pero no uniforme en el tumor. La intensidad fue de débil a moderada. Se presenta una imagen de magnificación intermedia (200x) y una vista de mayor ampliación (1000x).

La expresión de HSP90 también se observó en ambos grupos de muestras clínicas de SE (3/10, 30% - en las muestras de EAC y 19/44, 43% - en el caso del *TMA*). La expresión fue citoplasmática, en determinados casos con un marcaje punteado, y uniforme en los tumores. La intensidad fue de débil a moderada.

Se ha verificado una correlación directa entre las muestras que eran positivas para HSP90 y para IGF1R, siendo que más del 78% (18/23) de las muestras positivas para HSP90 eran también positivas para IGF1R. Lo inverso no se ha verificado, ya que apenas un 47% de las muestras positivas para IGF1R tenían también expresión de HSP90.

Tabla 14: Correlación entre las muestras de SE en relación a la expresión de IGF1R y HSP90 (del panel de 62 muestras de SE, se analizaron 53. IGF1R/HSP90+: IGF1R/HSP90 positivo, IGF1R/HSP90-: IGF1R/HSP90 negativo).

| | IGF1R+ | IGF1R- |
|---------|--------|--------|
| HSP90 + | 18 | 5 |
| HSP90 - | 20 | 10 |

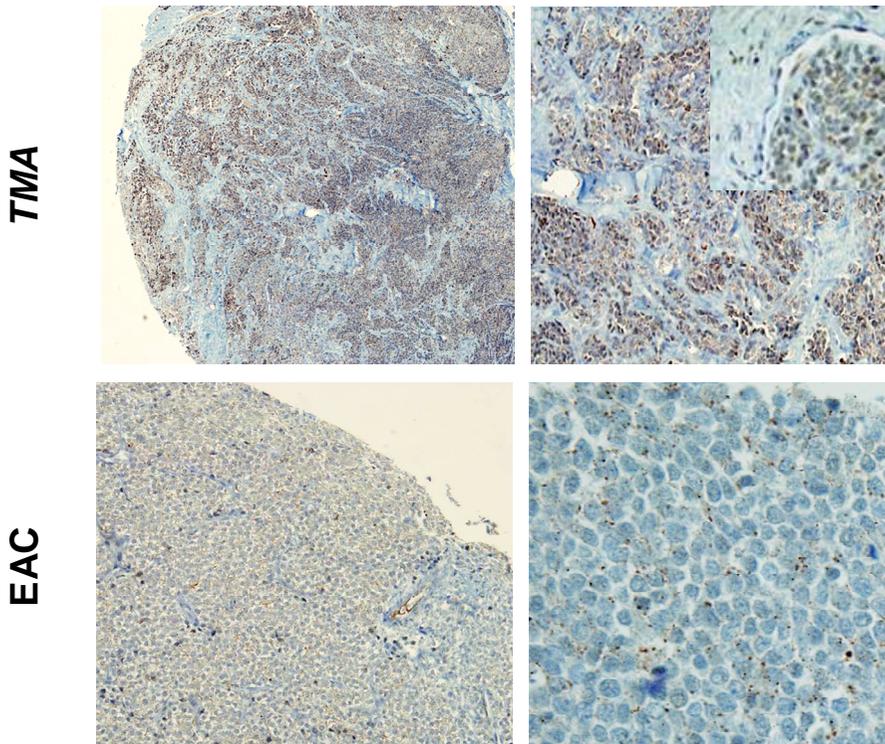


Figura 65: Evaluación ICQ de la expresión de HSP90 en las muestras clínicas de SE. La expresión de HSP90 fue citoplasmática y uniforme en el tumor. La intensidad fue de floja a moderada. Se presenta una imagen de poca ampliación del *TMA* (4x), una vista intermedia (200x) y una vista de mayor ampliación (1000x). En el caso de las muestras de *EAC*, se presenta una ampliación intermedia y otra de mayor ampliación.

5. Discusión

La búsqueda de nuevas formas de tratar los sarcomas es una necesidad urgente. El estudio y clarificación de los procesos que regulan el desarrollo y progresión tumoral es, desde luego, uno de los aspectos más importantes para que se pueden diseñar nuevas terapias “eficazmente dirigidas”.

En este trabajo se han estudiado la implicación de la ruta de señalización de IGF1R en el SE y cuáles son los efectos de su inhibición en líneas celulares del SE, verificándose que eran esenciales para la proliferación y supervivencia celulares. Se han estudiado posibles combinaciones con la inhibición de c-kit y la terapia convencional, obteniéndose resultados prometedores, sugiriéndose nuevas potenciales aplicaciones clínicas.

Con estudios de proteómica, se ha comprobado una expresión alterada de varias HSPs en las líneas celulares de SE tratadas con inhibidores de IGF1R/c-KIT, habiéndose decidido estudiar más en detalle la implicación de HSP90 en el SE. Se ha verificado que su expresión estaba incrementada en aquellas líneas celulares resistentes a los efectos de la inhibición de IGF1R/c-KIT y que su inhibición tenía efectos sensibilizadores al tratamiento, incluso en modelos xenógrafos, sugiriéndose nuevos mecanismos de resistencia al tratamiento no descritos hasta el momento en el SE.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican posibles aplicaciones clínicas de la inhibición de IGF1R y HSP90. Pasamos a continuación a comentar en más detalle cada uno de esos resultados, en el contexto de la literatura publicada hasta el presente momento.

5.1 Implicación de IGF1R y su ruta de señalización en el Sarcoma de Ewing

El IGF1R es un receptor membranar con alta homología con el receptor de Insulina (RI) que pertenece a un bucle autocrino muy relevante para la proliferación y supervivencia del SE (166). El bloqueo de este receptor (192, 219) es por lo tanto una posibilidad prometedora en la terapia del SE, y en un número significativo de estudios se demostró la inhibición experimental de este receptor usando anticuerpos monoclonales bloqueantes o varios fármacos. También se demostró la necesidad de tener una acción muy selectiva y específica para inhibir IGF1R, sin inhibir el RI a dosis terapéuticas (208, 220, 221, 223-228, 387).

5.1.1 Expresión de IGF1R y su ruta de señalización en el Sarcoma de Ewing

En nuestro panel de líneas de SE (representativas de los tres tipos de fusión EWS-ETS más comunes en el SE) se ha detectado una expresión constitutiva y constante de IGF1R. Su ruta de señalización estaba también activa en todas las líneas estudiadas, lo que está de acuerdo con lo descrito, (192, 219, 227, 387). No obstante, este receptor era expresado y activado a niveles muy diferentes en las líneas celulares estudiadas, lo que se cree que pueda estar relacionado con las diferencias de sensibilidad al tratamiento detectadas para cada una de esas líneas celulares.

5.1.2 Efectos de la inhibición de IGF1R con ADW742 en la ruta de señalización de IGF1R

El ADW742(ADW) es un inhibidor potente y específico de IGF1R (16 veces más específico para el IGF1R que para el RI (220)), en este trabajo fue capaz de inhibir la fosforilación de IGF1R activada por IGF1 (IC_{50} de fosforilación = 0,171-0,508 μ M) y su cascada de señalización,

especialmente AKT y mTOR. Estos datos están de acuerdo con lo publicado por Warshamana-Greene et al. y Mitsiades et al. (208, 220, 228), que estudiaron los efectos de la inhibición de IGF1R con ADW742 en cáncer de células pequeñas de pulmón, mieloma, enfermedades hematológicas y tumores sólidos. Con estos estudios se verificó que el ADW inhibía eficazmente la ruta de IGF1R, con una actividad antitumoral bastante significativa, logrando incluso la sensibilización de las líneas tratadas a los efectos de la terapia convencional.

Con relación a la activación de MAPK42/44, se verificó que el tratamiento con ADW tenía pocos efectos a nivel de la inhibición de su fosforilación, apenas reduciendo ligeramente la activación inducida por IGF1. Esto se puede deber a que estas proteínas sigan siendo activadas por otras ruta de señalización intracelular, como la de c-kit (155). Además, se ha propuesto la existencia de un “switching” de rutas de señalización tras la inhibición de una de ellas, o sea, que las señales bloqueadas de determinada ruta se “desplazan” hacia otra ruta y siguen teniendo las proteínas clave activadas. Estas interacciones ya se han demostrado con la ruta de EGFR y IGF1R, por Jones et al. (397-400).

Es interesante verificar que la sensibilidad de algunos miembros de esta ruta de señalización parecía depender de los niveles de expresión de IGF1R y de la activación basal de IGF1. Por ejemplo, la inhibición de p-AKT/mTOR fue más fuerte en las líneas SK-ES-1 y TC-71, que tenían una activación de IGF1R bastante alta, teniéndose la situación opuesta en el caso de la línea A673.

Todos estos datos sugieren un papel central de p-AKT/mTOR en la señalización celular del SE. En otras palabras, mientras que los niveles basales de IGF1R e IGF1 son predictivos de la respuesta de AKT/mTOR a ADW (de acuerdo con lo publicado por Scotlandi et al. (221)), los niveles de

p-AKT/mTOR podrán ser útiles a la hora de monitorizar la respuesta al tratamiento con técnicas no invasivas.

Visto esto, se propone la posibilidad del uso de pAKT/mTOR como posibles marcadores surrogados (“*surrogate markers*”) de la respuesta al tratamiento con ADW, ya que cumplen los requisitos necesarios (401):

- 1) p-AKT/mTOR están biológicamente asociados con las señales de supervivencia en las células de SE (218, 402, 403)
- 2) el tratamiento está directamente asociado con los niveles de p-AKT/mTOR
- 3) p-AKT/mTOR están mediando los efectos del tratamiento en la proliferación celular (esta molécula concentra las señales de IGF1R y c-kit y la reducción de su activación parece ser suficiente para reducir la proliferación, sin cambios de MAPK).

A nivel de los tumores de los pacientes de SE, que son mucho más complejos que las líneas celulares, es probable que se que necesite un panel de “*surrogate markers*” para predecir todo el efecto de determinado tratamiento, pero sugerimos que al menos AKT se incluya en un panel de ese tipo.

La expresión del VEGF mediada por IGF1R también se redujo tras el tratamiento con ADW742 en todas las líneas celulares, siendo los niveles de VEGF secretados al medio de cultivo menores en las condiciones tratadas que en las del control. Este hecho sugiere que la ruta de señalización de AKT es el principal mecanismo que está mediando la expresión de VEGF (en contra de lo publicado por Stramiello *et al.* (219)), resaltando de nuevo la importancia de la inhibición de la ruta de IGF1R en la patogénesis del SE, en este caso concreto, para la angiogenesis tumoral, así como lo verificó Guan *et al.* (404).

5.1.3 Efectos de la inhibición de IGF1R en la proliferación, apoptosis y ciclo celular de las líneas SE

De acuerdo con lo que se verificó con la inhibición de la fosforilación, el ADW inhibe también la proliferación celular de un modo dosis-dependiente, con un IC_{50} en el rango nanomolar a las 72 horas de tratamiento (550nM-1410nM). De una manera global, se han obtenido los mismos resultados con los dos tiempos de tratamiento, siendo el rango de concentraciones efectivas la única diferencia entre experimentos, indicando que los efectos detectados a las 72 horas son más específicos de la inhibición de IGF1R y no otros RTK. Estos efectos anti-proliferativos de la inhibición de IGF1R se han detectado también por otros grupos, utilizando no tan solo inhibidores de la actividad TK, sino también anticuerpos monoclonales ó dominantes negativos (209, 225-227).

De nuevo, las líneas celulares con niveles más altos de activación de IGF1R fueron más sensibles al tratamiento, confirmando la hipótesis de que los niveles basales de IGF1R e IGF1 son predictivos de la respuesta al tratamiento.

En estudios previos se ha demostrado que el bloqueo de la ruta de MAPK tras tratamiento con IMA era responsable por un moderado descenso de la proliferación (20-30%) en SE (155). Sin embargo, en este trabajo, el efecto mediado por ADW a través del bloqueo de la ruta de AKT/m-TOR es más pronunciado e induce un descenso de la proliferación más acentuado (40-70%).

La inhibición de esta ruta de señalización también explica la inducción de apoptosis observada (se inhiben las señales anti-apoptóticas de AKT) siendo, sin embargo, los niveles inferiores a los de la inhibición de proliferación.

Esto se debe a que los efectos antiproliferativos de ADW también se están dando a través de un efecto a nivel del ciclo celular, induciendo un

descenso en el número de células en la fase S, con una parada en la fase G1. La causa es la inhibición de mTOR, que a su vez inhibe la ciclina D1, lo que conlleva a una parada del ciclo celular en la fase G1 (405-410). De este modo, los datos obtenidos sugieren una vez más que la ruta de AKT/mTOR es determinante para la proliferación/resistencia a la apoptosis en el SE.

5.2 Efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit ó la terapia convencional del SE.

5.2.1. Efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit en el SE.

Como se ha descrito anteriormente que la ruta de señalización de SCF/KIT también está activa en el SE y que el tratamiento con IMA inhibe la ruta de las MAPKs, (155) se decidió estudiar la combinación de ADW con IMA para de este modo inhibir la fosforilación de MAPK42/44 más eficazmente.

Sin embargo, se verificó que el bloqueo de la fosforilación de estas proteínas no cambiaba significativamente con la combinación de fármacos. De todos modos, y sorprendentemente, se verificó que la fosforilación de AKT/m-TOR se inhibía con concentraciones incluso bastantes menores de ADW ($IC_{50} = 0,176-0,610\mu M$), obteniéndose efectos sinérgicos (IC 0,7), creyéndose por lo tanto que los principales beneficios de esta combinación se dan a través de la inhibición de la ruta de PI3K/AKT, hecho también observado por Warshamana-Greene et al. y Camirand et al. (228, 270).

En estos casos la inhibición de p-mTOR fue aun más fuerte que la de p-AKT. Esto se puede deber al hecho de que se estén detectando, junto con el efecto directo y bien descrito de AKT en la activación de m-TOR (198, 326, 402, 406, 409), otro tipo de ruta de activación de m-TOR independiente de AKT que esté siendo inhibida por IMA pero no por ADW, como la sugerida por Edinger et al. (411).

Los estudios de la combinación de ADW+IMA mostraron también que la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis eran mayores en estos casos que en los de los monoterapias, algo también detectado por Warshamana-Greene et al. (228).

Es importante resaltar el hecho de que se han obtenido niveles de sinergia bastantes significativos a las 72 horas (que, como se dijo anteriormente, es el tiempo de tratamiento con efectos más específicos de la inhibición de IGF1R), con un IC del orden del 0,5, especialmente con concentraciones bajas de ambos fármacos. De hecho, mientras que con las concentraciones más altas de ambos fármacos se obtuvo apenas aditividad (condiciones del tratamiento durante 24 horas), con concentraciones más bajas la sinergia fue evidente (condiciones del tratamiento durante 72 horas). Estos datos tienen especial interés para posibles futuras aplicaciones clínicas, ya que usando concentraciones más bajas de cada fármaco, se podrán eliminar muchos de los efectos indeseados de la toxicidad farmacológica, tan usual en el tratamiento de cáncer.

También es importante resaltar que esta sinergia fue más marcada en aquellas líneas celulares que tenían mayor expresión de IGF1R, lo que indica que estas líneas celulares podrían ser más dependientes de esta molécula para la supervivencia y proliferación celulares.

En lo que se refiere al ciclo celular, la combinación de ADW + IMA no obtuvo resultados mejores que en los monoterapias, pudiéndose afirmar que los beneficios de este tratamiento combinado advienen de la inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis, como se ha verificado también por otros grupos (228, 412-415).

Además de los efectos comentados, la combinación de ADW+IMA también fue efectiva en reducir los niveles de VEGF, resaltándose de nuevo los beneficios de la terapia combinatoria. Este hecho tiene una importante relevancia clínica ya que en estudios recientes se demostró que VEGF es el

regulador más importante de la angiogenesis en el SE y que por lo tanto es una diana terapéutica en este tipo de tumores (404, 416-420).

Los datos obtenidos son importantes porque sugieren una posible aplicación de IMA en la terapia del SE. Aunque IMA sólo no tenga efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos satisfactorios, cuando se combina con ADW potencia la eficacia de la inhibición de IGF1R.

Es cierto que, como se cita en la introducción, se cuestione la importancia de la señalización de c-kit en el SE. Se ha visto incluso que células tumorales de SE que expresaban c-kit eran insensibles al tratamiento con IMA (421), lo que hacía creer que tendría poca importancia a nivel de la terapia de SE. Sin embargo, y una vez que la mayoría de los sarcomas tiene múltiples loops autocrinos alterados, se cree que la utilización de IMA cuando se combina con ADW (u otros inhibidores de RTKs) pueda ser especialmente importante para bloquear eficazmente las diversas moléculas “downstream” comunes a esos loops (como AKT, ERK ó mTOR), sin que se permita el “switching” de rutas.

5.2.2 Efectos de la combinación de la inhibición de IGF1R con la terapia convencional del SE.

Como se verificó que el IGF1 es capaz de atenuar los efectos de la terapia convencional del SE (208, 228), se decidió combinar también el ADW con la DXR ó la VCR, dos de los fármacos más utilizados en la terapia del SE, con el fin de sensibilizar las líneas celulares del SE al tratamiento con estos fármacos.

Se observó que el ADW realmente sensibiliza las células del SE al tratamiento con estos fármacos, resultados también obtenidos por otros grupos (208, 223). Estos resultados van en contra de lo que se ha descrito para la combinación del AEW (su derivado mejorado altamente selectivo para IGF1R) con estos mismos fármacos (221), ya que en nuestros estudios

la combinación del ADW con DXR ó la VCR es sinérgica para la inhibición de la proliferación celular e inducción de apoptosis. Este hecho es de interés clínico ya que la dosis de ambos fármacos se podrá disminuir con la combinación, protegiendo los pacientes de SE de la toxicidad farmacológica.

En los estudios del crecimiento independiente de anclaje y movilidad se verificó que el ADW suprimía drásticamente el crecimiento de colonias y la movilidad celular, incluso con concentraciones tan bajas cuanto 100nM. Las distintas combinaciones apenas tuvieron resultados aditivos. Estos resultados sugieren el posible beneficio del uso de ADW *in vivo*, estando probablemente involucrado en procesos de supervivencia relacionadas con contacto célula-célula y célula-matriz (422-426).

De una manera global, con relación a los resultados obtenidos con la inhibición de la ruta de IGF1R, se puede afirmar que la expresión y activación de IGF1R determinan, por lo menos parcialmente, la respuesta al tratamiento con ADW, en las líneas celulares del SE. Es evidente que todos los efectos detectados dependen de la línea celular tratada, siendo posible plantear que sería importante estratificar los pacientes del SE en el momento del diagnóstico con respecto a la expresión y activación tumoral de IGF1R.

Se ha descrito anteriormente una extensa expresión de IGF1R en un sub-grupo de biopsias del SE, asociada a un alto grado de proliferación y fusiones EWS-Fli no-tipo 1 (P=0,015) (427). De este modo, sería de especial interés la utilización de la combinación ADW + IMA, DXR ó VCR en aquellos pacientes que presentasen alta tasa de expresión/activación de IGF1R/fusión EWS-FLI1 no tipo1, los paciente que presentan exactamente peor pronóstico cuando son tratados con DXR ó VCR (70, 71).

El análisis de la expresión de IGF1R en la rutina clínica puede no ser suficiente para asegurar que este sea una diana terapéutica. Para

asegurar el éxito de determinado inhibidor de la actividad cinasa en cáncer, es importante que se cumplan por lo menos tres requisitos:

- 1) que el receptor este constitutivamente activo, es decir, fosforilado (por ligando ó mutaciones activantes)
- 2) que la actividad de ese receptor sea importante para la supervivencia celular
- 3) que el inhibidor esté disponible por vía oral.

Los resultados obtenidos demuestran que el ADW cumple estos requisitos en el SE y que su combinación con IMA, DXR ó VCR es una fuerte alternativa terapéutica en el SE.

5.3 Identificación del patrón de expresión proteica en líneas de SE tratadas con ADW742 y/ó Imatinib.

Los resultados obtenidos con los estudios de la inhibición de la ruta de señalización de IGF1R, han traído a la luz la problemática de la existencia de diferentes niveles de sensibilidad al tratamiento por parte de los pacientes de SE, y la importancia de los diferentes contextos/mecanismos celulares que están implicados en la ganancia de resistencia al tratamiento en SE.

Con los estudios de proteómica se pudo identificar un extenso panel de proteínas cuyos niveles de expresión cambiaban tras el tratamiento con ADW/IMA. Esas proteínas están implicadas en diversos procesos celulares, como la proliferación, apoptosis, transcripción, ciclo celular, respuesta al stress, entre otros, confirmando una vez más que la inhibición de las rutas de IGF1R/KIT tiene diversos efectos a nivel celular. A fecha de hoy, se han detectado también cambios de expresión de proteínas relacionadas con los mismos procesos celulares, en algunos estudios proteómicos basados en la inhibición de diversas rutas de señalización (428-432), pero solamente tenemos conocimiento de un estudio proteómico basado en el SE (433), publicado en 2007, en el que se estudiaron los efectos de la quercetina, un

inhibidor de las HSPs, en neuroblastoma y SE, habiendo un cierto paralelismo con los resultados obtenidos en esta tesis y que pasamos a discutir a continuación.

Algunas de las proteínas detectadas son bastante comunes en los estudios de proteómica, como la actina, la PRDX1, la SET ó la vinculina (434-437), pero otras parecían ser bastante específicas de la inhibición de las rutas de IGF1R/KIT, como la PTD4, EBP1 ó RhoA (438-444). Fue interesante verificar que muchas proteínas relacionadas con el stress tenían su expresión alterada, así como otras proteínas relacionadas con cáncer pero no descritas en el ámbito del SE, como la Tau ó la proteína Lupus LA (445-450).

Con el análisis de interacción de rutas de señalización, fue posible seleccionar un panel más reducido de proteínas a estudiar, más detalladamente por WB y qRT-PCR, eliminando de este modo las proteínas cuyos cambios se debían apenas a posibles artefactos de la técnica. Se han seleccionado 8 proteínas que se encuentran en puntos clave, conectando diversas rutas intracelulares importantes para la proliferación y supervivencia celulares y que se creyó ser las más relevantes en el SE.

Con los estudios de las técnicas de WB y qRT-PCR se comprobó que, en primer lugar, los resultados obtenidos con los estudios de proteómica para las proteínas seleccionadas no eran apenas artefactos de la técnica sino que la expresión de esas proteínas en cuestión se encontraba realmente alterada tras el tratamiento.

En segundo lugar, y una vez más, se comprobó que los resultados obtenidos dependían de los tiempos de tratamiento y de la línea celular tratada. De una manera global, los cambios tempranos fueron debidos a una respuesta al stress, con incremento de la expresión de HSP90, HSP70 ó GRP75, cambios también detectados en otras líneas celulares de SE por Zanini et al. (433). Los cambios más tardíos fueron, como esperábamos

(basándonos en los resultados obtenidos anteriormente), debidos a la inducción de la apoptosis y a la inhibición de la proliferación celular, detectándose un incremento de p23 y una reducción de RhoA. En ningún momento se han detectado cambios significativos de la expresión de AKT ó mTOR, por lo que se pone la hipótesis de que, por un lado, los principales cambios que se producen tras el tratamiento con ADW/IMA se dan a nivel de la fosforilación de estas proteínas y no a nivel de su expresión y por otro lado que los niveles de expresión ó el cambio de expresión son tan bajos que la técnica de proteómica 2D no es capaz de detectarlos.

En la línea celular más resistente al tratamiento (A673) se ha visto principalmente un estímulo de la respuesta al stress a tiempos bajos y en la línea más sensible (A4573) un aumento de expresión de las proteínas relacionadas con la apoptosis y proliferación.

En base a estos resultados, nos planteamos las siguientes preguntas: ¿cual sería la importancia de los mecanismos de respuesta al stress en el SE? y ¿cuál sería su relación con la ganancia de resistencia al tratamiento? puesto que se sabe de la sensibilidad de las células cancerigenas al tratamiento con diferentes fármacos y que depende de varias moléculas, incluyendo también las de la respuesta al stress (274, 278, 354).

En estos estudios se ha visto que los tratamientos con ADW/IMA indujeron cambios en la expresión, no de una, sino de varias proteínas involucradas en diferentes niveles de formación del complejo de “chaperoning”. Se indujo un cambio de expresión, no tan sólo de las HSP70 y HSP90, que están involucradas en la formación del complejo de respuesta al stress temprano e intermedio (271), respectivamente, como también de p23, una proteína que está involucrada en la maduración del mismo complejo, dando fuerza a la hipótesis de que los mecanismos de respuesta al stress tendrían un papel importante en el SE.

Basándonos en todos estos datos se planteó un estudio más detallado de la implicación de la respuesta al stress en el SE.

5.4 Implicación de HSP90 en Sarcoma de Ewing

Con los resultados obtenidos en los estudios de proteómica, WB y qRT-PCR, se tenían 4 evidencias que indicaban la posible importancia de HSP90 en el SE:

- 1) el mayor grupo de proteínas con cambios de expresión fue el de la respuesta al stress;
- 2) HSP90 ha aparecido 4 veces conectando las rutas de interacción en el estudio con el software Ingenuity;
- 3) HSP90 fue una de las proteínas cuya expresión cambió en ambas líneas celulares, tanto a nivel del ARNm como de la proteína, sugiriendo un mecanismo de respuesta celular común en el SE y
- 4) HSP90 fue precisamente una de las proteínas sobre-expresadas en los variantes celulares de TC-71 resistentes a ET-743, como está descrito por Manara et al. (451).

Con la obtención de estos datos, se decidió estudiar la expresión/función de HSP90 en un panel de 5 líneas de SE.

5.4.1 Expresión de HSP90 en líneas celulares de SE

Se ha verificado que la expresión de HSP90 se incrementaba en las líneas A673 y TTC466, que fueron precisamente las líneas celulares más resistentes al tratamiento con ADW/IMA, a las 24 horas de tratamiento.

Con estos datos, se puede, por lo menos en parte, explicar la resistencia de estas líneas celulares a la inhibición del IGF1R/c-KIT. Cabe la

posibilidad de que estas líneas celulares hayan desarrollado de algún modo un mecanismo de respuesta al stress, que esté contra-balanceando los efectos del tratamiento con estos fármacos, que se inicia en fases tempranas del tratamiento (24 horas) y que las haga más resistentes que a las demás líneas celulares. Estos mecanismos se han descrito para diversos tipos de tumores, como el cáncer de mama, el mieloma múltiple y el cáncer de colon, entre otros (452-455), pero, por lo menos en nuestro conocimiento, nada se ha descrito para el SE.

Es importante resaltar que los diferentes niveles de sensibilidad al tratamiento no se han podido correlacionar con el tipo de translocación EWS-ETS de cada línea celular ó con los cambios secundarios ya descritos en el SE, como la pérdida de p16/INK4 ó la mutación de p53 (101, 145, 149, 384-386, 456), dejando apenas la inducción de los mecanismos de respuesta al stress como explicación posible para ello.

Basándonos en estos resultados, nos planteamos cuales serían los efectos de la inhibición de HSP90 en el mismo panel de líneas de SE.

5.4.2. Inhibición de HSP90 en líneas celulares de SE.

Para inhibir HSP90 se utilizó el derivado de la geldanamicina, el 17-AAG, descrito en detalle en la introducción, en el punto 1.3.2..

Hasta esta fecha, se han publicado numerosos estudios en los que se ha verificado que ésta nueva molécula tiene múltiples efectos en variados tipos de cáncer, siendo, sólo a título de ejemplo, capaz de inhibir la proliferación de sarcoma sinovial y cáncer de ovario, regular la ruta de AKT e inducir una parada de ciclo celular y muerte celular en linfoma de Hodgkin ó controlar las señales proliferativas/apoptóticas en mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda (390, 457-460).

Se verificó que el tratamiento con 17-AAG inducía una disminución de la proliferación de un modo dosis-dependiente en todas las líneas de SE y un incremento de la apoptosis, especialmente en aquellas líneas resistentes al tratamiento (A673 y TTC466). Estos resultados están de acuerdo con los datos publicados por otros grupos, en otros tipos de tumores (390, 458-464).

Se podría argumentar que las diferencias de sensibilidad al tratamiento se deberían al hecho de que, por ejemplo, A673 tenga una mutación en el gen BRAF (456), lo que le haría más sensible a la inhibición de HSP90. Sin embargo, TTC466 tiene una respuesta similar y no tiene ni esa mutación ni otro tipo de cambio (como la mutación de p53 (145) ó la pérdida de p16/INK4 (149)) que pueda explicar estos resultados y no se han encontrado tampoco en la bibliografía otro tipo de cambios que puedan explicar estos resultados, lo que sugiere independencia de cambios genéticos de estas líneas celulares. También se considera que estos resultados son independientes del tipo de transcrito, ya que TTC466 tiene un tipo de fusión diferente de la de A673, y tiene comportamiento similar, mientras que TC-71 tiene el mismo tipo de fusión que A673 y tiene comportamiento diferente de A673.

Por otro lado, las líneas sensibles al tratamiento con ADW y/ó IMA se mostraron poco alteradas bajo tratamiento con 17-AAG, lo que se puede explicar por el hecho de que al no tener el mecanismo de respuesta al stress desarrollado, sean insensibles a este tipo de tratamiento, algo también detectado por Zanini et al. (433).

Los efectos antiproliferativos/pro-apoptóticos de 17-AAG en las líneas de SE han podido explicarse con los estudios de WB e IP para HSP90.

Con estos estudios se ha demostrado que el tratamiento con 17-AAG reguló la expresión de IGF1R, KIT y AKT al reducir su interacción física con HSP90. También se ha reducido la fosforilación de AKT, mTOR y

MAPK42/44 y, por lo tanto, la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis, se han dado, por lo menos en parte, por la inhibición de estas rutas de señalización.

La interacción física de HSP90 con KIT y AKT ha sido descrita con detalle anteriormente (271, 465), por lo que eran de esperar los resultados obtenidos (AKT es una proteína cliente de HSP90 y 17-AAG disminuye los niveles de expresión de KIT (463)).

Aunque se hayan descrito muchos receptores hormonales ó TK como proteínas cliente de HSP90 (271, 280, 282, 306, 458, 466), y muchos grupos hayan demostrado la inhibición de IGF1R tras el tratamiento con inhibidores de HSP90 (459, 467, 468), hasta la fecha IGF1R todavía no se ha descrito como proteína cliente de HSP90.

En los estudios realizados, se demuestra claramente esta interacción física por inmunoprecipitación, aunque sería interesante tener un estudio termodinámico y cinético que detallase la interacción HSP90-IGF1R. Este hallazgo es de especial interés ya que la ruta de señalización de IGF1R es de gran relevancia en la patogénesis de los sarcomas (157, 166, 218, 269, 469, 470).

En base a los datos obtenidos, se pueden sugerir dos posibles de mecanismos de resistencia al tratamiento:

- 1) La función de IGF1R/KIT es mantenida tras el tratamiento por su interacción con HSP90 y /ó
- 2) HSP90 también está confiriendo resistencia a través de otras rutas relacionadas con la proliferación y apoptosis al estabilizar proteínas cliente como AKT ó KIT.

Confirmada la implicación de HSP90 en las líneas de SE, se decidió estudiar si su inhibición realmente sensibilizaba las líneas resistentes al tratamiento con ADW/IMA.

5.5 Efectos de la combinación de la inhibición HSP90 con la de IGF1R ó c-kit en el SE.

Como se ha citado anteriormente, el hecho de que los tumores malignos sean el resultado de un conjunto de múltiples cambios genéticos, hace que la mono-terapia sea ineficaz por la presencia de rutas de señalización colaterales. De este modo es interesante usar la inhibición de las HSP combinada con otro tipo de fármacos, de manera que reduzca la resistencia adquirida por las células tumorales a lo largo de la progresión maligna al tratamiento convencional.

Por todo ello, se consideró que el tratamiento con 17-AAG podría mejorar la susceptibilidad de las células del SE al tratamiento con ADW/IMA, al inhibir varias proteínas involucradas en la señalización de supervivencia y resistencia al tratamiento, especialmente en las líneas A673 y TTC466, ampliamente insensibles a ambos fármacos.

Los resultados obtenidos confirmaron esta hipótesis y demostraron que el diseño de las combinaciones de diferentes fármacos puede ser muy eficiente, siendo necesaria una combinación específica para cada tejido/célula.

Se verificó que el tratamiento con 17-AAG sensibilizaba las líneas de SE a los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos de ADW/IMA, especialmente en A673 y TTC466, en las cuales se obtuvieron efectos sinérgicos.

Estos datos se corroboran con algunos estudios publicados, donde se verificó que el 17-AAG inhibía la proliferación de no sólo líneas celulares de GIST, AML y CML (Leucemia Mieloide Aguda y Crónica) resistentes a Imatinib sino también de líneas celulares de SE y sarcoma sinovial y que su combinación con IMA tenía efectos bastante satisfactorios, en algunos casos sinérgicos (388, 460, 463, 471-473). En lo que respecta a la combinación de 17-AAG con la inhibición de IGF1R, poco se ha publicado hasta el presente

momento, sabiéndose apenas que el tratamiento con 17-AAG afecta a la ruta de IGF1R en MM, cáncer de páncreas y de mama (356, 459, 474) y que su combinación con inhibidores de mTOR (rapamicina) tiene efectos sinérgicos en MM (389). De todos modos, y en el ámbito del SE, se sabe que la inhibición de las HSPs sensibiliza las células de SE a los efectos de la doxorubicina (433) y el cisplatino (467), con efectos sinérgicos, y que presenta resultados prometedores en la terapia de pacientes con tumores sólidos (475).

Aunque, como se ha referido anteriormente, la relevancia de KIT sea cuestionable en el SE (155), los resultados obtenidos sugieren que una posible combinación de IMA con 17-AAG podría tener una aplicación clínica interesante en estos casos. Además, podrá ser también aplicable mas allá del SE, especialmente en los casos de GIST ó dermatofibrosarcoma protuberans resistentes a IMA, inhibiendo la acción de HSP90, lo que da aún más fuerza a los resultados obtenidos.

Para comprobar los resultados observados con el 17-AAG y también la hipótesis de que HSP90 estaría realmente implicada en la resistencia al tratamiento con ADW/IMA, se han realizado estudios adicionales con HSP90-siARN en aquellas líneas más resistentes a los efectos de la inhibición de IGF1R/c-kit y se indujo la sobre-expresión de IGF1R con un clon de HSP90 en aquellas líneas más sensibles al tratamiento.

Con ambos estudios se ha comprobado que la hipótesis propuesta era correcta.

Con los estudios de la inhibición de HSP90 con siARN, en primer lugar, se comprobó que los efectos de 17-AAG eran específicos de la inhibición de HSP90 y no debidos a efectos inespecíficos de toxicidad farmacológica. En segundo lugar, se comprobó que la inhibición de HSP90

realmente sensibilizaba las líneas resistentes al tratamiento con ADW/IMA, tanto a nivel de efectos anti-proliferativos como pro-apoptóticos.

Por otro lado, al inducir la expresión de HSP90 con el clon HSP90 en las líneas sensibles al tratamiento con ADW/IMA, se pudo incrementar su resistencia a este tratamiento, alcanzándose niveles de completo bloqueo de la apoptosis, y alta estimulación de la proliferación, confirmándose de nuevo la hipótesis de que el desarrollo de la respuesta al stress es un mecanismo de resistencia al tratamiento, algo que hasta el momento no se había descrito en el SE.

En los estudios de los xenograftos de SE, se verificó que las células tumorales de A673 respondían bastante bien al tratamiento con 17-AAG, solo ó combinado con AEW.

Los estudios inmunohistoquímicos demostraron una posible degradación de las proteínas clientes de HSP90 tras el tratamiento, lo que explica el efecto del retraso en el crecimiento tumoral, que fue también descrito por Banerji et al., Mitsiades et al. y Williams et al. (390, 459, 476).

En el caso de la combinación, hasta esta fecha no se conocen datos descritos por ningún otro grupo modelos *in vivo*. En estos casos la inhibición de HSP90 no tan solo redujo la tasa del crecimiento tumoral sino que también redujo el tamaño de los tumores durante el experimento, confirmando la sugerencia de una posible aplicación de la combinación de la inhibición de HSP90+IGF1R en el tratamiento del SE.

Con los resultados obtenidos, se ha demostrado claramente que HSP90 es una posible diana terapéutica en el SE, y por ello podemos decir que se ha descrito por primera vez en este trabajo, y a su vez afirmar que está involucrado en mecanismos de resistencia al tratamiento en el SE.

Su inhibición es sinérgica con el tratamiento con ADW/IMA, y por lo tanto, de valor terapéutico en el SE.

En base a los ensayos clínicos iniciados recientemente, usando inhibidores de IGF1R, se sugiere la evaluación de la expresión de HSP90 como un factor predictivo de la respuesta al tratamiento.

Es interesante resaltar que la inhibición de HSP90 podrá tener efectos mucho más amplios a nivel del cáncer, ya que sus proteínas cliente incluyen proteínas que contribuyen en todos los 6 facetas moleculares del cáncer:

- 1) auto-suficiencia en las señales de crecimiento,
- 2) insensibilidad a las señales anti-crecimiento,
- 3) evasión de apoptosis,
- 4) angiogenesis sostenida,
- 5) invasión de tejidos y metástasis y
- 6) potencial replicativo ilimitado,

Por todos estos factores nos planteamos cuales serán los beneficios que se obtendrán con este nuevo modelo de tratamiento en cáncer.

5.6 Comprobación de los resultados obtenidos en muestras clínicas de pacientes de SE.

En último lugar, para correlacionar los datos obtenidos en esta tesis doctoral con la clínica de SE y verificar la aplicabilidad de las hipótesis propuestas, se estudió la expresión de las proteínas más relevantes en estos estudios en un panel de muestras clínicas de SE.

5.6.1 Comprobación de los estudios de la inhibición de IGF1R

Se comprobó que ambos receptores, IGF1R y c-kit se encontraban expresados en más de la mitad de las muestras clínicas analizadas, coincidiendo así en lo que se ha descrito ya en la literatura publicada (155,

192, 427, 477-479), confirmando por todo ello la posible aplicabilidad del tratamiento con ADW (ú otros inhibidores de IGF1R) y/ó IMA en el SE.

Se han detectado diferentes niveles de expresión de IGF1R en las muestras analizadas, lo que corrobora la hipótesis de que los pacientes de SE tengan diversos niveles de activación de esta ruta de señalización. Este dato es especialmente importante porque aquellos pacientes que tengan niveles de expresión/activación más bajos del receptor serán menos sensibles al tratamiento con inhibidores de IGF1R y, por lo tanto, será muy útil el análisis de la expresión de IGF1R en la rutina clínica como factor predictivo de la respuesta a la terapia.

Por dificultades técnicas (especialmente por la pérdida de fosforilación de las muestras durante su procesamiento) no se pudo estudiar la activación de la ruta de IGF1R, ya que no ha sido posible detectar la fosforilación de IGF1R ó AKT en las muestras clínicas.

En lo que respecta a la expresión de AKT, todas las muestras han tenido reactividad nula, pero se cree que estos resultados no son reales sino falsos negativos, especialmente porque Mora et al. (480) han descrito un estudio clínico en el cual se detectaba un 85% de positividad para AKT en muestras clínicas de SE.

De todos modos, ha sido posible detectar y analizar la expresión y fosforilación de m-TOR, obteniéndose un 36,4% de expresión y un 37,5% de activación basal.

Es importante resaltar que las muestras analizadas se han tomado antes del tratamiento, por lo que no se pudo hacer un estudio de la posible aplicación de pAKT/m-TOR para monitorizar la respuesta al tratamiento.

5.6.2 Comprobación de los estudios de la implicación de HSP90 en el SE

De modo análogo a lo obtenido en los estudios con las líneas celulares del SE, se detectó un subgrupo significativo de muestras clínicas con expresión difusa de HSP90.

Esto no está obviamente relacionado con ningún tipo de respuesta al stress ya que estas biopsias se han tomado antes del tratamiento. De todos modos, este dato es importante ya que sugiere que los mecanismos de respuesta al stress ya están activos en algunos pacientes de SE en el momento del diagnóstico, y subraya la importancia de estudiar los niveles de expresión de HSP90 en muestras de pacientes incluidos en los ensayos clínicos que usen agentes bloqueantes de IGF1R. En esos pacientes, la sobre-expresión de HSP90 podría ser un marcador de resistencia al tratamiento a esos mismos agentes bloqueantes. Es interesante verificar que casi un 80% de las muestras positivas para HSP90 también tenían IGF1R expresado. Sin embargo, apenas un 50% de las muestras con positividad para IGF1R mostraban positividad para HSP90, lo que evidencia una vez más la importancia de estudiar los niveles de expresión de HSP90 en los pacientes incluidos en los ensayos clínicos que usen agentes bloqueantes de IGF1R.

Revisando todos los datos obtenidos, se pueden formular las siguientes conclusiones:

6. Conclusiones

CONCLUSIONES:

1. El IGF1R y los componentes de su ruta de señalización se encuentran expresados en las líneas celulares de SE y en los tumores humanos, de manera constitutiva y constante. Los niveles de expresión y activación basales de este receptor dependen de cada línea celular/paciente.
2. La estimulación con el ligando IGF1 desencadena la transmisión de señales a través de las rutas de señalización intracelular de AKT y MAPK42/44.
3. El ADW742 es capaz de inhibir la fosforilación de IGF1R, de manera dosis dependiente, inhibiendo también su transducción de señales.
4. Los efectos de ADW742 en los componentes del bucle de IGF1R dependen de los niveles de expresión y activación basal de este receptor en cada línea celular.
5. El bloqueo de IGF1R con ADW742 conlleva a una inhibición de la proliferación, inducción de la apoptosis y parada del ciclo celular de las líneas celulares del SE. También reduce significativamente la movilidad celular y el crecimiento independiente de anclaje de las líneas celulares de SE.
6. La combinación de ADW742 con Imatinib tuvo efectos sinérgicos a nivel de la inhibición de la ruta de AKT/mTOR, lo que explica el incremento observado en los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos del tratamiento, junto con la reducción de los niveles de VEGF secretados para el medio extracelular.

Conclusiones

7. Los efectos de la combinación ADW+IMA han dependido de los niveles de expresión/activación basal de IGF1R de cada línea celular, confirmando la necesidad del estudio de esta molécula como factor predictivo de la respuesta a la terapia para estratificar los pacientes de SE.
8. El bloqueo de IGF1R con ADW742 ha sensibilizado las líneas celulares del SE a los efectos de los agentes quimioterápicos convencionales, la Doxorubicina y la Vincristina, con efectos sinérgicos a nivel de la inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis.
9. Los estudios de proteómica, WB y qRT-PCR han demostrado que el tratamiento con ADW/IMA afecta a diversas proteínas involucradas en diferentes procesos celulares. Los efectos obtenidos han dependido ampliamente de los tiempos de tratamiento y de la línea celular tratada, confirmando la existencia de diferentes niveles de sensibilidad al tratamiento, que son de extrema importancia en el suceso de la terapia del SE.
10. HSP90 se expresa en todas las líneas de SE y en un subgrupo significativo de muestras clínicas, siendo su expresión incrementada tras tratamiento con ADW/IMA, en fases tempranas, en las líneas celulares resistentes al tratamiento.
11. La inhibición de HSP90 con 17-AAG indujo una disminución de la proliferación e incremento de apoptosis en todas las líneas de SE, siendo especialmente eficaz en las líneas resistentes al tratamiento con ADW/IMA. Esto se debe a que el 17-AAG está inhibiendo la función de “chaperona” de HSP90, llevando a una mayor degradación de algunas proteínas cliente de HSP90, como AKT, KIT e IGF1R (por primera vez descrita como proteína cliente de HSP90).

12. La inhibición de HSP90 sensibilizó las líneas celulares de SE resistentes al tratamiento con ADW/IMA a los efectos de estos fármacos, obteniéndose sinergia a nivel de la reducción de la proliferación celular e inducción de apoptosis, (más marcada en estos casos de que en las líneas sensibles).
13. La sobre-expresión de HSP90 en las líneas de SE sensibles al tratamiento con ADW/IMA indujo una resistencia a los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos de estos fármacos, confirmando que el desarrollo de la respuesta al stress es un mecanismo de resistencia al tratamiento en el SE, factor a tener en cuenta a la hora de planear la terapia de estos pacientes, siendo de especial interés evaluar en ese momento los niveles de expresión de HSP90.
14. Los tumores obtenidos en los modelos *in vivo* han respondido bien al tratamiento con 17-AAG. Se redujo la tasa del crecimiento tumoral y, en el caso de la combinación de 17-AAG+AEW, se obtuvo incluso una reducción del tamaño tumoral.

17-AAG - 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycina

A/N - apoptosis/necrosis

ADP - adenisina bifosfato

ADW - ADW742

AEW - AEW541

ADN - ácido desoxirribonucleico

ARN - ácido ribonucleico

ATP - adenosine trifosfato

AV - anexina V

BSA - albumina bovina sérica

DMSO - dimetilsufoxido

DXR - Doxorubicina

EFST - Familia de los Sarcomas de Ewing

FISH - Hibridación fluorescente *in situ*

GIST - tumores del estroma gastrointestinal

HSP90 - proteína de choque térmico de 90 kDa

HSP - proteínas de choque térmico

IC - índice de combinación

IC50 - valor de la concentración de un determinado fármaco que induce una inhibición del 50% de la proliferación, apoptosis, fosforilación, etc.

ICQ - inmunocitoquímica

IGF1 - factor de crecimiento similar a insulina

IGF1R - receptor del factor de crecimiento similar a insulina

IGFBPs - proteínas de unión a IGF

IMA - Imatinib

IP - inmunoprecipitación

IP - yoduro de propídeo

IRS - sustrato del receptor de insulina

MAPK - proteína cinasa activada por mitogeno

Abreviaturas

mTOR - proteína diana de la rapamicina de mamíferos
ON - durante la noche (over-night)
PC - proteína cliente
PNET - Tumor neuroectodérmico primitivo
RTK - receptor tirosina cinasa
RT-PCR - Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
SBF - suero bovino fetal
SCF - factor de crecimiento de las células madre
SE - Sarcoma de Ewing
siARN - ARN pequeños de interferencia
ST - solución de trabajo
TA - temperatura ambiente
TK - tirosina cinasa
TL - tampón de lisis
TMA - Microarray de tejidos
TT - tampón de transferencia
VCR - Vincristina
VD -vector de destino
VEGF - factor de crecimiento vascular endotelial
WB - western blotting

8. Bibliografía

1. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 2003;3(9):685-94.
2. Skubitz KM, D'Adamo DR. Sarcoma. *Mayo Clin Proc* 2007;82(11):1409-32.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56(2):106-30.
5. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57(1):43-66.
6. Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer letters* 2007;254(1):1-10.
7. Stout A. A tumor of the ulnar nerve. *Proc NY Pathol Soc* 1918;12:2-12.
8. Ewing J. Diffuse Endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc* 1921;21:17-24.
9. Ewing J. Further report on endothelial myeloma of bone. *Proc NY Pathol Soc* 1924;24:93-101.
10. de Alava E, Gerald WL. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000;18(1):204-13.
11. Bacci G, Ferrari S, Rosito P, *et al.* [Ewing's sarcoma of the bone. Anatomoclinical study of 424 cases]. *Minerva Pediatr* 1992;44(7-8):345-59.
12. Koscielniak E, Harms D, Henze G, *et al.* Results of treatment for soft tissue sarcoma in childhood and adolescence: a final report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study CWS-86. *J Clin Oncol* 1999;17(12):3706-19.
13. Klingebiel T, Pertl U, Hess CF, *et al.* Treatment of children with relapsed soft tissue sarcoma: report of the German CESS/CWS REZ 91 trial. *Med Pediatr Oncol* 1998;30(5):269-75.
14. Koscielniak E, Jurgens H, Winkler K, *et al.* Treatment of soft tissue sarcoma in childhood and adolescence. A report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study. *Cancer* 1992;70(10):2557-67.

15. Koscielniak E, Treuner J, Jurgens H, *et al.* [Treatment of soft tissue sarcomas in childhood and adolescence: results of the CWS-81 multicenter therapy study]. *Klin Padiatr* 1991;203(4):211-9.
16. Khoury JD. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol* 2005;12(4):212-20.
17. Jemal A, Clegg LX, Ward E, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004;101(1):3-27.
18. Young JL, Jr., Ries LG, Silverberg E, Horm JW, Miller RW. Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* 1986;58(2 Suppl):598-602.
19. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, *et al.* Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006;11(5):503-19.
20. Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol* 2003;56(2):96-102.
21. Baliko F, Bright T, Poon R, Cohen B, Egan SE, Alman BA. Inhibition of notch signaling induces neural differentiation in Ewing sarcoma. *The American journal of pathology* 2007;170(5):1686-94.
22. Carlei F, Polak JM, Ceccamea A, *et al.* Neuronal and glial markers in tumours of neuroblastic origin. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1984;404(3):313-24.
23. Knezevich SR, Hendson G, Mathers JA, *et al.* Absence of detectable EWS/FLI1 expression after therapy-induced neural differentiation in Ewing sarcoma. *Human pathology* 1998;29(3):289-94.
24. Staeger MS, Hutter C, Neumann I, *et al.* DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer research* 2004;64(22):8213-21.
25. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *The American journal of pathology* 1987;127(3):507-18.
26. Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer research* 2005;65(11):4633-44.

27. Ladanyl M, Heinemann FS, Huvos AG, Rao PH, Chen QG, Jhanwar SC. Neural differentiation in small round cell tumors of bone and soft tissue with the translocation t(11;22)(q24;q12): an immunohistochemical study of 11 cases. *Human pathology* 1990;21(12):1245-51.
28. Lizard-Nacol S, Lizard G, Justrabo E, Turc-Carel C. Immunologic characterization of Ewing's sarcoma using mesenchymal and neural markers. *The American journal of pathology* 1989;135(5):847-55.
29. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 2007;11(5):421-9.
30. Riggi N, Cironi L, Provero P, *et al.* Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer research* 2005;65(24):11459-68.
31. Torchia EC, Jaishankar S, Baker SJ. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer research* 2003;63(13):3464-8.
32. Widhe B, Widhe T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82(5):667-74.
33. Sneppen O, Hansen LM. Presenting symptoms and treatment delay in osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Acta Radiol Oncol* 1984;23(2-3):159-62.
34. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Su SL, DeAngelis P, Lane JM, Rettig WJ. Biochemical and genetic characterization of the HBA71 Ewing's sarcoma cell surface antigen. *Cancer research* 1991;51(1):336-40.
35. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. *The American journal of pathology* 1991;139(2):317-25.
36. Weidner N, Tjoe J. Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: antibody that recognizes glycoprotein p30/32MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *The American journal of surgical pathology* 1994;18(5):486-94.
37. Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, *et al.* CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. *Cancer research* 2000;60(18):5134-42.
38. Scotlandi K. Targeted therapies in Ewing's sarcoma. *Advances in experimental medicine and biology* 2006;587:13-22.

39. Scotlandi K, Perdichizzi S, Bernard G, *et al.* Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 2006;42(1):91-6.
40. Franchi A, Pasquinelli G, Cenacchi G, *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural investigation of neural differentiation in Ewing sarcoma/PNET of bone and soft tissues. *Ultrastruct Pathol* 2001;25(3):219-25.
41. Navarro S, Cavazzana AO, Llombart-Bosch A, Triche TJ. Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118(6):608-15.
42. Lizard-Nacol S, Mugneret F, Turc-Carel C, Justrabo E. Immunohistological characterization of a Ewing's sarcoma case. *Cancer Detect Prev* 1988;12(1-6):297-302.
43. Dierick AM, Roels H, Langlois M. The immunophenotype of Ewing's sarcoma. An immunohistochemical analysis. *Pathol Res Pract* 1993;189(1):26-32.
44. Lucas DR, Bentley G, Dan ME, Tabaczka P, Poulik JM, Mott MP. Ewing sarcoma vs lymphoblastic lymphoma. A comparative immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 2001;115(1):11-7.
45. Greco MA, Steiner GC, Fazzini E. Ewing's sarcoma with epithelial differentiation: fine structural and immunocytochemical study. *Ultrastruct Pathol* 1988;12(3):317-25.
46. Daugaard S, Kamby C, Sunde LM, Myhre-Jensen O, Schiodt T. Ewing's sarcoma. A retrospective study of histological and immunohistochemical factors and their relation to prognosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989;414(3):243-51.
47. Moll R, Lee I, Gould VE, Berndt R, Roessner A, Franke WW. Immunocytochemical analysis of Ewing's tumors. Patterns of expression of intermediate filaments and desmosomal proteins indicate cell type heterogeneity and pluripotential differentiation. *The American journal of pathology* 1987;127(2):288-304.
48. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Glasser DB, Huvos AG, Rettig WJ. Comparison of cell surface antigen HBA71 (p30/32MIC2), neuron-specific enolase, and vimentin in the immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Surg Pathol* 1992;16(8):746-55.

49. Garin-Chesa P, Fellingner EJ, Huvos AG, *et al.* Immunohistochemical analysis of neural cell adhesion molecules. Differential expression in small round cell tumors of childhood and adolescence. *The American journal of pathology* 1991;139(2):275-86.
50. Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, *et al.* Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Human pathology* 1999;30(8):911-8.
51. Schmidt D, Harms D. [Cooperative Ewing's Sarcoma Studies 81/86: pathologico-anatomic and immunohistochemical findings and differential diagnosis of Ewing sarcoma]. *Klinische Padiatrie* 1988;200(3):236-42.
52. Amann G, Zoubek A, Salzer-Kuntschik M, Windhager R, Kovar H. Relation of neurological marker expression and EWS gene fusion types in MIC2/CD99-positive tumors of the Ewing family. *Human pathology* 1999;30(9):1058-64.
53. de Alava E. Molecular pathology in sarcomas. *Clin Transl Oncol* 2007;9(3):130-44.
54. de Alava E, Pardo J. Ewing tumor: tumor biology and clinical applications. *Int J Surg Pathol* 2001;9(1):7-17.
55. Hill DA, O'Sullivan MJ, Zhu X, *et al.* Practical application of molecular genetic testing as an aid to the surgical pathologic diagnosis of sarcomas: a prospective study. *Am J Surg Pathol* 2002;26(8):965-77.
56. Meier VS, Kuhne T, Jundt G, Gudat F. Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid determination of exon combinations. *Diagn Mol Pathol* 1998;7(1):29-35.
57. Miettinen M. From morphological to molecular diagnosis of soft tissue tumors. *Adv Exp Med Biol* 2006;587:99-113.
58. Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jurgens H. Factors associated with tumor volume and primary metastases in Ewing tumors: results from the (E)CESS studies. *Ann Oncol* 1999;10(9):1073-7.
59. McLean TW, Hertel C, Young ML, *et al.* Late events in pediatric patients with Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of bone: the Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21(6):486-93.

60. Miser JS, Goldsby RE, Chen Z, *et al.* Treatment of metastatic Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of increasing the dose intensity of chemotherapy--a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49(7):894-900.
61. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, *et al.* Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3108-14.
62. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, *et al.* Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. *J Clin Oncol* 2003;21(1):85-91.
63. Fizazi K, Dohollou N, Blay JY, *et al.* Ewing's family of tumors in adults: multivariate analysis of survival and long-term results of multimodality therapy in 182 patients. *J Clin Oncol* 1998;16(12):3736-43.
64. Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, *et al.* Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 1998;9(3):275-81.
65. Pfeleiderer C, Zoubek A, Gruber B, *et al.* Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. *International journal of cancer* 1995;64(2):135-9.
66. Zoubek A, Ladenstein R, Windhager R, *et al.* Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. *International journal of cancer* 1998;79(1):56-60.
67. Hoffmann C, Ahrens S, Dunst J, *et al.* Pelvic Ewing sarcoma: a retrospective analysis of 241 cases. *Cancer* 1999;85(4):869-77.
68. Saeter G, Elomaa I, Wahlqvist Y, *et al.* Prognostic factors in bone sarcomas. *Acta Orthop Scand Suppl* 1997;273:156-60.
69. Ahrens S, Hoffmann C, Jabar S, *et al.* Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. Cooperative Ewing Sarcoma Study. *Med Pediatr Oncol* 1999;32(3):186-95.
70. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, *et al.* Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 1996;14(4):1245-51.

71. de Alava E, Kawai A, Healey JH, *et al.* EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998;16(4):1248-55.
72. Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer research* 1999;59(7):1428-32.
73. Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, *et al.* Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *British journal of cancer* 1997;75(10):1403-9.
74. Tarkkanen M, Kiuru-Kuhlefelt S, Blomqvist C, *et al.* Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114(1):35-41.
75. Brisset S, Schleiermacher G, Peter M, *et al.* CGH analysis of secondary genetic changes in Ewing tumors: correlation with metastatic disease in a series of 43 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;130(1):57-61.
76. Maurici D, Perez-Atayde A, Grier HE, Baldini N, Serra M, Fletcher JA. Frequency and implications of chromosome 8 and 12 gains in Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;100(2):106-10.
77. Ozaki T, Paulussen M, Poremba C, *et al.* Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32(2):164-71.
78. Hattinger CM, Rumpler S, Strehl S, *et al.* Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24(3):243-54.
79. Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, *et al.* Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer* 2001;91(11):2156-64.
80. Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, *et al.* Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(1):168-77.
81. Dunst J, Schuck A. Role of radiotherapy in Ewing tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42(5):465-70.
82. Pinkel D. Cyclophosphamide in children with cancer. *Cancer Chemother Rep* 1961;12:187-90.

Bibliografía

83. Pinkel D. Cyclophosphamide in children with cancer. *Cancer* 1962;15:42-9.

84. Hustu HO, Pinkel D, Pratt CB. Treatment of clinically localized Ewing's sarcoma with radiotherapy and combination chemotherapy. *Cancer* 1972;30(6):1522-7.

85. Hustu HO, Holton C, James D, Jr., Pinkel D. Treatment of Ewing's sarcoma with concurrent radiotherapy and chemotherapy. *J Pediatr* 1968;73(2):249-51.

86. Rosen G, Wollner N, Tan C, *et al.* Proceedings: Disease-free survival in children with Ewing's sarcoma treated with radiation therapy and adjuvant four-drug sequential chemotherapy. *Cancer* 1974;33(2):384-93.

87. Kung FH, Pratt CB, Vega RA, *et al.* Ifosfamide/etoposide combination in the treatment of recurrent malignant solid tumors of childhood. A Pediatric Oncology Group Phase II study. *Cancer* 1993;71(5):1898-903.

88. Miser JS, Kinsella TJ, Triche TJ, *et al.* Ifosfamide with mesna uroprotection and etoposide: an effective regimen in the treatment of recurrent sarcomas and other tumors of children and young adults. *J Clin Oncol* 1987;5(8):1191-8.

89. EURO-E.W.I.N.G. SC. EURO-E.W.I.N.G. 99 Study Manual- EUROpean Ewing Tumor Initiative of National Groupsewing Tumor Studies 99. 2006 [cited; Available from: <http://euro-ewing.uni-muenster.de/ewing99.html>]

90. Sandoval C, Meyer WH, Parham DM, *et al.* Outcome in 43 children presenting with metastatic Ewing sarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1992. *Med Pediatr Oncol* 1996;26(3):180-5.

91. Cangir A, Vietti TJ, Gehan EA, *et al.* Ewing's sarcoma metastatic at diagnosis. Results and comparisons of two intergroup Ewing's sarcoma studies. *Cancer* 1990;66(5):887-93.

92. May WA, Denny CT. Biology of EWS/FLI and related fusion genes in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;220:143-50.

93. Delattre O, Zucman J, Melot T, *et al.* The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331(5):294-9.

94. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, *et al.* DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the

t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Molecular and cellular biology* 1994;14(5):3230-41.

95. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, *et al.* Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(12):5752-6.

96. May WA, Lessnick SL, Braun BS, *et al.* The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Molecular and cellular biology* 1993;13(12):7393-8.

97. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992;359(6391):162-5.

98. Turc-Carel CS. [Contribution of cytogenetics to the diagnosis of Ewing's sarcoma and small round cell tumors]. *Bull Cancer* 1991;78(1):77-84.

99. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A. [Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma]. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences* 1983;296(23):1105-7.

100. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G. [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences* 1983;296(23):1101-3.

101. Selleri L, Hermanson GG, Eubanks JH, Lewis KA, Evans GA. Molecular localization of the t(11;22)(q24;q12) translocation of Ewing sarcoma by chromosomal in situ suppression hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88(3):887-91.

102. Dockhorn-Dworniczak B, Schafer KL, Dantcheva R, *et al.* [Molecular genetic detection of t(11;22)(q24;q12) translocation in Ewing sarcoma and malignant peripheral neuroectodermal tumors]. *Der Pathologe* 1994;15(2):103-12.

103. Plougastel B, Mattei MG, Thomas G, Delattre O. Cloning and chromosome localization of the mouse *Ews* gene. *Genomics* 1994;23(1):278-81.

104. Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. *Genomics* 1993;18(3):609-15.

105. Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *The EMBO journal* 1996;15(18):5022-31.

106. Bertolotti A, Melot T, Acker J, Vigneron M, Delattre O, Tora L. EWS, but not EWS-FLI-1, is associated with both TFIID and RNA polymerase II: interactions between two members of the TET family, EWS and hTAFII68, and subunits of TFIID and RNA polymerase II complexes. *Molecular and cellular biology* 1998;18(3):1489-97.

107. Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, Reddy ES. The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 1994;9(10):3087-97.

108. Rossow KL, Janknecht R. The Ewing's sarcoma gene product functions as a transcriptional activator. *Cancer research* 2001;61(6):2690-5.

109. Felsch JS, Lane WS, Peralta EG. Tyrosine kinase Pyk2 mediates G-protein-coupled receptor regulation of the Ewing sarcoma RNA-binding protein EWS. *Curr Biol* 1999;9(9):485-8.

110. Belyanskaya LL, Delattre O, Gehring H. Expression and subcellular localization of Ewing sarcoma (EWS) protein is affected by the methylation process. *Exp Cell Res* 2003;288(2):374-81.

111. Hromas R, Klemsz M. The ETS oncogene family in development, proliferation and neoplasia. *Int J Hematol* 1994;59(4):257-65.

112. Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(12):1371-87.

113. Dittmer J, Nordheim A. Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1998;1377(2):F1-11.

114. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993;211(1-2):7-18.

115. Kim CA, Phillips ML, Kim W, *et al.* Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *The EMBO journal* 2001;20(15):4173-82.

116. Maroulakou IG, Bowe DB. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 2000;19(55):6432-42.

117. Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, *et al.* Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Molecular and cellular biology* 2000;20(15):5643-52.
118. Deramaudt BM, Remy P, Abraham NG. Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins. *J Cell Biochem* 1999;72(3):311-21.
119. Tamir A, Howard J, Higgins RR, *et al.* Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. *Molecular and cellular biology* 1999;19(6):4452-64.
120. Pereira R, Quang CT, Lesault I, Dolznig H, Beug H, Ghysdael J. FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene* 1999;18(8):1597-608.
121. Zhang D, Paley AJ, Childs G. The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(29):18086-91.
122. Arvand A, Bastians H, Welford SM, Thompson AD, Ruderman JV, Denny CT. EWS/FLI1 up regulates mE2-C, a cyclin-selective ubiquitin conjugating enzyme involved in cyclin B destruction. *Oncogene* 1998;17(16):2039-45.
123. Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, *et al.* Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 2001;20(25):3258-65.
124. Hahm KB, Cho K, Lee C, *et al.* Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999;23(2):222-7.
125. Im YH, Kim HT, Lee C, *et al.* EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer research* 2000;60(6):1536-40.
126. May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* 1997;17(4):495-7.

127. Mendiola M, Carrillo J, Garcia E, *et al.* The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *International journal of cancer* 2006;118(6):1381-9.

128. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, *et al.* Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(17):15105-15.

129. Thompson AD, Braun BS, Arvand A, *et al.* EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* 1996;13(12):2649-58.

130. Zwerner JP, Joo J, Warner KL, *et al.* The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. *Oncogene* 2007.

131. Wai DH, Schaefer KL, Schramm A, *et al.* Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *International journal of oncology* 2002;20(3):441-51.

132. Zwerner JP, May WA. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* 2001;20(5):626-33.

133. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular and cellular biology* 2004;24(16):7275-83.

134. Ramakrishnan R, Fujimura Y, Zou JP, *et al.* Role of protein-protein interactions in the antiapoptotic function of EWS-Fli-1. *Oncogene* 2004;23(42):7087-94.

135. Kovar H, Aryee DN, Jug G, *et al.* EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 1996;7(4):429-37.

136. Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer research* 2004;64(4):1266-77.

137. Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, *et al.* EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer research* 2003;63(23):8338-44.

138. Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 1994;6(2):146-51.

139. Kaneko Y, Kobayashi H, Handa M, Satake N, Maseki N. EWS-ERG fusion transcript produced by chromosomal insertion in a Ewing sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18(3):228-31.
140. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, *et al.* A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995;10(6):1229-34.
141. Urano F, Umezawa A, Yabe H, *et al.* Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis. *Jpn J Cancer Res* 1998;89(7):703-11.
142. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, *et al.* Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15(2):115-21.
143. Peter M, Couturier J, Pacquement H, *et al.* A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 1997;14(10):1159-64.
144. Mastrangelo T, Modena P, Tornielli S, *et al.* A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene* 2000;19(33):3799-804.
145. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, *et al.* Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;89(4):783-92.
146. Maitra A, Roberts H, Weinberg AG, Geradts J. Aberrant expression of tumor suppressor proteins in the Ewing family of tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125(9):1207-12.
147. Honoki K, Stojanovski E, McEvoy M, *et al.* Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. *Cancer* 2007;110(6):1351-60.
148. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Lab Invest* 2001;81(6):803-14.
149. Wei G, Antonescu CR, de Alava E, *et al.* Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;89(4):793-9.
150. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, *et al.* Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005;23(3):548-58.

151. Kovar H, Auinger A, Jug G, *et al.* Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. *Oncogene* 1993;8(10):2683-90.

152. Kovar H, Jug G, Aryee DN, *et al.* Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 1997;15(18):2225-32.

153. Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y. Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes. *British journal of cancer* 2001;84(6):768-75.

154. Furukawa M, Raffeld M, Mateo C, *et al.* Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3233-42.

155. Gonzalez I, Andreu EJ, Panizo A, *et al.* Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):751-61.

156. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000;96(3):925-32.

157. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20(6):1692-703.

158. Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 2002;26(4):486-92.

159. Bozzi F, Tamborini E, Negri T, *et al.* Evidence for activation of KIT, PDGFRalpha, and PDGFRbeta receptors in the Ewing sarcoma family of tumors. *Cancer* 2007;109(8):1638-45.

160. Ahmed A, Gilbert-Barness E, Lacson A. Expression of c-kit in Ewing family of tumors: a comparison of different immunohistochemical protocols. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7(4):342-7.

161. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13(3):205-20.

162. Do I, Araujo ES, Kalil RK, *et al.* Protein expression of KIT and gene mutation of c-kit and PDGFRs in Ewing sarcomas. *Pathol Res Pract* 2007;203(3):127-34.
163. Longo VD, Finch CE. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 2003;299(5611):1342-6.
164. Kurmasheva RT, Houghton PJ. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766(1):1-22.
165. Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des* 2007;13(7):663-9.
166. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature reviews* 2004;4(7):505-18.
167. Samani AA, Chevet E, Fallavollita L, Galipeau J, Brodt P. Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cells expressing the extracellular domain of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cancer research* 2004;64(10):3380-5.
168. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81(3):935-9.
169. Underwood LE, D'Ercole AJ. Insulin and insulin-like growth factors/somatomedins in fetal and neonatal development. *Clin Endocrinol Metab* 1984;13(1):69-89.
170. Bohula EA, Playford MP, Macaulay VM. Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as anti-cancer treatment. *Anti-cancer drugs* 2003;14(9):669-82.
171. Daughaday WH. A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspect Biol Med* 1989;32(2):194-211.
172. Daughaday WH. Endocrinology--the way we were: a personal history of somatomedin. *Growth Horm IGF Res* 2006;16 Suppl A:S3-5.
173. Van den Brande JL. A personal view on the early history of the insulin-like growth factors. *Horm Res* 1999;51 Suppl 3:149-75.
174. Tollefsen SE, Lajara R, McCusker RH, Clemmons DR, Rotwein P. Insulin-like growth factors (IGF) in muscle development. Expression of IGF-I,

the IGF-I receptor, and an IGF binding protein during myoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* 1989;264(23):13810-7.

175. Carrascosa A, Audi L. Human studies on the biological actions of IGF-1. Evidence suggesting that human fetal and postnatal epiphyseal cartilage is a target tissue for IGF-1 action. *J Pediatr Endocrinol* 1993;6(3-4):257-61.

176. Hollinger J. Factors for osseous repair and delivery. Part I. *J Craniofac Surg* 1993;4(2):102-8.

177. Johansson AG, Lindh E, Ljunghall S. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and bone: a clinical review. *J Intern Med* 1993;234(6):553-60.

178. McCarthy TL, Centrella M. Regulation of IGF activity in bone. *Adv Exp Med Biol* 1993;343:407-14.

179. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor (IGF) and bone. *Connect Tissue Res* 1989;20(1-4):277-82.

180. Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol* 2005;152(3):327-32.

181. Kulik-Rechberger B, Furmaga-Jablonska W, Rechberger T. [The influence of IGF-1 on the biosynthesis of type I and III collagen during puberty]. *Ginekol Pol* 1999;70(5):323-7.

182. Ullrich A, Gray A, Tam AW, *et al.* Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* 1986;5(10):2503-12.

183. Ullrich A, Riedel H, Yarden Y, *et al.* Protein kinases in cellular signal transduction: tyrosine kinase growth factor receptors and protein kinase C. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 2:713-24.

184. Pedrini MT, Giorgino F, Smith RJ. cDNA cloning of the rat IGF I receptors: structural analysis of rat and human IGF I and insulin receptors reveals differences in alternative splicing and receptor-specific domain conservation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202(2):1038-46.

185. Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 1994;8(1):40-50.

186. Parvaresh S, Yesilkaya T, Baer K, Al-Hasani H, Klein HW. 14-3-3 binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation. *FEBS letters* 2002;532(3):357-62.
187. Tennagels N, Telting D, Parvaresh S, Maassen JA, Klein HW. Identification of Ser(1275) and Ser(1309) as autophosphorylation sites of the human insulin receptor in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(2):387-93.
188. Sekharam M, Zhao H, Sun M, *et al.* Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer research* 2003;63(22):7708-16.
189. Weber A, Huesken C, Bergmann E, Kiess W, Christiansen NM, Christiansen H. Coexpression of insulin receptor-related receptor and insulin-like growth factor 1 receptor correlates with enhanced apoptosis and dedifferentiation in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5683-92.
190. Galvan V, Logvinova A, Sperandio S, Ichijo H, Bredesen DE. Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *The Journal of biological chemistry* 2003;278(15):13325-32.
191. Scotlandi K, Benini S, Nanni P, *et al.* Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer research* 1998;58(18):4127-31.
192. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, *et al.* Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer research* 1996;56(20):4570-4.
193. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002;23(6):824-54.
194. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16(1):3-34.
195. Clemmons DR, Busby WH, Arai T, *et al.* Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res* 1995;6(2-4):357-66.
196. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346 Pt 3:561-76.

Bibliografía

197. Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 2002;111(3):293-303.
198. Hill MM, Hemmings BA. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2002;93(2-3):243-51.
199. Hill MM, Hemmings BA. Analysis of protein kinase B/Akt. *Methods Enzymol* 2002;345:448-63.
200. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, *et al.* Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Molecular and cellular biology* 1999;19(10):7203-15.
201. Prisco M, Romano G, Peruzzi F, Valentini B, Baserga R. Insulin and IGF-I receptors signaling in protection from apoptosis. *Horm Metab Res* 1999;31(2-3):80-9.
202. Derijard B, Hibi M, Wu IH, *et al.* JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76(6):1025-37.
203. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265(5173):808-11.
204. Pollak M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer* 2000;36(10):1224-8.
205. Djavan B, Waldert M, Seitz C, Marberger M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol* 2001;19(4):225-33.
206. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001;131(11 Suppl):3109S-20S.
207. Korc M. Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7(1):25-41.
208. Warshamana-Greene GS, Litz J, Buchdunger E, Garcia-Echeverria C, Hofmann F, Krystal GW. The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(4):1563-71.
209. Sachdev D, Yee D. The IGF system and breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2001;8(3):197-209.

210. Surmacz E. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5(1):95-105.
211. Neudauer CL, McCarthy JB. Insulin-like growth factor I-stimulated melanoma cell migration requires phosphoinositide 3-kinase but not extracellular-regulated kinase activation. *Exp Cell Res* 2003;286(1):128-37.
212. Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Patel D, Herlyn M. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer research* 2001;61(19):7318-24.
213. Yeh AH, Bohula EA, Macaulay VM. Human melanoma cells expressing V600E B-RAF are susceptible to IGF1R targeting by small interfering RNAs. *Oncogene* 2006;25(50):6574-81.
214. Pozzi G, Guidi M, Laudicina F, *et al.* IGF-I stimulates proliferation of spontaneously immortalized human keratinocytes (HACAT) by autocrine/paracrine mechanisms. *J Endocrinol Invest* 2004;27(2):142-9.
215. Kim B, van Golen CM, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I signaling in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2004;23(1):130-41.
216. Chamaon K, Kirches E, Kanakis D, Braeuninger S, Dietzmann K, Mawrin C. Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(1):86-92.
217. Rasmuson T, Grankvist K, Jacobsen J, Olsson T, Ljungberg B. Serum insulin-like growth factor-1 is an independent predictor of prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Acta Oncol* 2004;43(8):744-8.
218. Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 2003;22(58):9282-7.
219. Strammiello R, Benini S, Manara MC, *et al.* Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Hormone and metabolic research Hormon- und Stoffwechselforschung* 2003;35(11-12):675-84.
220. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, *et al.* Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 2004;5(3):221-30.

221. Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, *et al.* Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer research* 2005;65(9):3868-76.
222. Benini S, Manara MC, Cerisano V, *et al.* Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *International journal of cancer* 2004;108(3):358-66.
223. Benini S, Manara MC, Baldini N, *et al.* Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res* 2001;7(6):1790-7.
224. Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, *et al.* In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer cell* 2004;5(3):231-9.
225. Hailey J, Maxwell E, Koukouras K, Bishop WR, Pachter JA, Wang Y. Neutralizing anti-insulin-like growth factor receptor 1 antibodies inhibit receptor function and induce receptor degradation in tumor cells. *Molecular cancer therapeutics* 2002;1(14):1349-53.
226. Maloney EK, McLaughlin JL, Dagdigian NE, *et al.* An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer research* 2003;63(16):5073-83.
227. Scotlandi K, Avnet S, Benini S, *et al.* Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. *International journal of cancer* 2002;101(1):11-6.
228. Warshamana-Greene GS, Litz J, Buchdunger E, Hofmann F, Garcia-Echeverria C, Krystal GW. The insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor kinase inhibitor NVP-ADW742, in combination with STI571, delineates a spectrum of dependence of small cell lung cancer on IGF-I and stem cell factor signaling. *Molecular cancer therapeutics* 2004;3(5):527-35.
229. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90(4):1345-64.
230. Jakimiuk B, Mroczko B, Szmitkowski M. [Stem cell factor (SCF) in clinical practice]. *Przegl Lek* 2003;60(10):663-7.
231. Lawicki S, Mroczko B, Szmitkowski M. [Hematopoietic cytokines as tumor markers]. *Postepy Hig Med Dosw* 2001;55(3):449-65.

232. Mroczko B, Szmitkowski M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Jurkowska G. Stem cell factor and macrophage-colony stimulating factor in patients with pancreatic cancer. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(3):256-60.
233. Mroczko B, Szmitkowski M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Jurkowska G. Hematopoietic cytokines in the sera of patients with pancreatic cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(2):146-50.
234. Geissler EN, Liao M, Brook JD, *et al.* Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter. *Somat Cell Mol Genet* 1991;17(2):207-14.
235. Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell* 1992;3(3):349-62.
236. Toyota M, Hinoda Y, Itoh F, Tsujisaki M, Imai K, Yachi A. Expression of two types of kit ligand mRNAs in human tumor cells. *Int J Hematol* 1992;55(3):301-4.
237. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, *et al.* Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal* 1987;6(11):3341-51.
238. Spritz RA, Strunk KM, Lee ST, *et al.* A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12. *Genomics* 1994;22(2):431-6.
239. Giebel LB, Strunk KM, Spritz RA. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics* 1991;9(3):435-45.
240. Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(23):2924-31.
241. Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *The American journal of pathology* 1999;154(1):53-60.
242. Li SQ, O'Leary TJ, Sobin LH, Erozan YS, Rosenthal DL, Przygodzki RM. Analysis of KIT mutation and protein expression in fine needle aspirates of gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Acta Cytol* 2000;44(6):981-6.

243. Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, *et al.* A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 1998;115(5):1090-5.
244. Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M. C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(12):1321-8.
245. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, *et al.* Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer research* 1999;59(17):4297-300.
246. Assamaki R, Sarlomo-Rikala M, Lopez-Guerrero JA, *et al.* Array comparative genomic hybridization analysis of chromosomal imbalances and their target genes in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(6):564-76.
247. Lasota J, Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* 2006;23(2):91-102.
248. Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008.
249. Lasota J, vel Dobosz AJ, Wasag B, *et al.* Presence of homozygous KIT exon 11 mutations is strongly associated with malignant clinical behavior in gastrointestinal stromal tumors. *Lab Invest* 2007;87(10):1029-41.
250. Deberry C, Mou S, Linnekin D. Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem J* 1997;327 (Pt 1):73-80.
251. Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, *et al.* Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* 2008.
252. Linnekin D, Weiler SR, Mou S, *et al.* JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol* 1996;95(3-4):224-8.
253. Paner GP, Silberman S, Hartman G, Micetich KC, Aranha GV, Alkan S. Analysis of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res* 2003;23(3B):2253-60.
254. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, *et al.* JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 1996;87(9):3688-93.
255. Arena F, Nicotina PA, Arena S, Romeo C, Zuccarello B, Romeo G. C-kit positive interstitial cells of Cajal network in primary obstructive megareter. *Minerva Pediatr* 2007;59(1):7-11.

256. Metzger R, Rolle U, Fiegel HC, Franke FE, Muenstedt K, Till H. C-kit receptor in the human vas deferens: distinction of mast cells, interstitial cells and interepithelial cells. *Reproduction* 2008;135(3):377-84.
257. Min KW, Leabu M. Interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST): facts, speculations, and myths. *J Cell Mol Med* 2006;10(4):995-1013.
258. Diallo R, Ting E, Gluz O, *et al.* C-kit expression in high-risk breast cancer subgroup treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2006;90:177-85.
259. Eroglu A, Sari A. Expression of c-kit proto-oncogene product in breast cancer tissues. *Med Oncol* 2007;24(2):169-74.
260. Broxmeyer HE, Maze R, Miyazawa K, *et al.* The kit receptor and its ligand, steel factor, as regulators of hemopoiesis. *Cancer Cells* 1991;3(12):480-7.
261. Catlett JP, Leftwich JA, Westin EH, Grant S, Huff TF. c-kit expression by CD34+ bone marrow progenitors and inhibition of response to recombinant human interleukin-3 following exposure to c-kit antisense oligonucleotides. *Blood* 1991;78(12):3186-91.
262. Natali PG, Nicotra MR, Sures I, Santoro E, Bigotti A, Ullrich A. Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer research* 1992;52(22):6139-43.
263. Ohneda O, Yanai N, Obinata M. Combined action of c-kit and erythropoietin on erythroid progenitor cells. *Development* 1992;114(1):245-52.
264. Ratajczak MZ, Luger SM, DeRiel K, Abraham J, Calabretta B, Gewirtz AM. Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(5):1710-4.
265. Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer research* 1996;56(2):370-6.
266. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, *et al.* KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *The American journal of pathology* 2000;156(3):791-5.

267. Turner AM, Zsebo KM, Martin F, Jacobsen FW, Bennett LG, Broudy VC. Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-kit receptors. *Blood* 1992;80(2):374-81.
268. Cohen PS, Chan JP, Lipkuns kaya M, Biedler JL, Seeger RC. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group. *Blood* 1994;84(10):3465-72.
269. Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, *et al.* The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *The American journal of pathology* 2000;157(6):2123-31.
270. Camirand A, Pollak M. Co-targeting IGF-1R and c-kit: synergistic inhibition of proliferation and induction of apoptosis in H 209 small cell lung cancer cells. *British journal of cancer* 2004;90(9):1825-9.
271. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature reviews* 2005;5(10):761-72.
272. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 1962;18(12):571-3.
273. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151-91.
274. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993;259(5100):1409-10.
275. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 1999;24(4):136-41.
276. Leppa S, Sistonen L. Heat shock response--pathophysiological implications. *Annals of medicine* 1997;29(1):73-8.
277. Smith DF, Whitesell L, Katsanis E. Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacological reviews* 1998;50(4):493-514.
278. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(19):1564-72.
279. Jackson SE, Queitsch C, Toft D. Hsp90: from structure to phenotype. *Nature structural & molecular biology* 2004;11(12):1152-5.

280. Solit DB, Rosen N. Hsp90: a novel target for cancer therapy. *Current topics in medicinal chemistry* 2006;6(11):1205-14.
281. Thomas X, Campos L, Le QH, Guyotat D. Heat shock proteins and acute leukemias. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 2005;10(3):225-35.
282. Zhang H, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2004;82(8):488-99.
283. Welch WJ, Feramisco JR. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry* 1982;257(24):14949-59.
284. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters* 2004;562(1-3):11-5.
285. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(10):1640-8.
286. Pearl LH, Prodromou C. Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv Protein Chem* 2001;59:157-86.
287. Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, *et al.* Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(23):12524-9.
288. Meyer P, Prodromou C, Hu B, *et al.* 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):647-58.
289. Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, *et al.* Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(14):12208-14.
290. Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 2000;25(1):24-8.
291. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(18):8324-8.

292. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(20):10832-7.
293. Beliakoff J, Whitesell L. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anti-cancer drugs* 2004;15(7):651-62.
294. Whitesell L, Sutphin PD, Pulcini EJ, Martinez JD, Cook PH. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Molecular and cellular biology* 1998;18(3):1517-24.
295. Chant ID, Rose PE, Morris AG. Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry. *British journal of haematology* 1995;90(1):163-8.
296. Bartsch R, Wenzel C, Zielinski CC, Steger GG. HER-2-positive breast cancer: hope beyond trastuzumab. *BioDrugs* 2007;21(2):69-77.
297. Bishop SC, Burlison JA, Blagg BS. Hsp90: a novel target for the disruption of multiple signaling cascades. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7(4):369-88.
298. Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW. Hsp90--from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(2):241-6.
299. Cullinan SB, Whitesell L. Heat shock protein 90: a unique chemotherapeutic target. *Semin Oncol* 2006;33(4):457-65.
300. Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci* 2007;32(3):517-30.
301. Peng C, Li D, Li S. Heat shock protein 90: a potential therapeutic target in leukemic progenitor and stem cells harboring mutant BCR-ABL resistant to kinase inhibitors. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2007;6(18):2227-31.
302. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, *et al.* A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003;425(6956):407-10.
303. Bagatell R, Whitesell L. Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Molecular cancer therapeutics* 2004;3(8):1021-30.
304. Whitesell L, Bagatell R, Falsey R. The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3(5):349-58.

305. Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol Med* 2004;10(6):283-90.
306. Ge J, Normant E, Porter JR, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of hydroquinone derivatives of 17-amino-17-demethoxygeldanamycin as potent, water-soluble inhibitors of Hsp90. *Journal of medicinal chemistry* 2006;49(15):4606-15.
307. Neckers L. Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer. *Current topics in medicinal chemistry* 2006;6(11):1163-71.
308. Pacey S, Banerji U, Judson I, Workman P. Hsp90 inhibitors in the clinic. *Handbook of experimental pharmacology* 2006(172):331-58.
309. Sharp S, Workman P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Advances in cancer research* 2006;95:323-48.
310. Zhang H, Chung D, Yang YC, *et al.* Identification of new biomarkers for clinical trials of Hsp90 inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5(5):1256-64.
311. Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 1976;6(7):511-9.
312. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19(56):6550-65.
313. Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-related cancer* 2002;9(2):75-85.
314. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 2002;1(2):117-23.
315. Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 1989;32(10):2344-52.
316. Hernandez-Boluda JC, Cervantes F. Imatinib mesylate (Gleevec, Glivec): a new therapy for chronic myeloid leukemia and other malignancies. *Drugs Today (Barc)* 2002;38(9):601-13.
317. Druker BJ. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5:S70-6.

318. Segal GM, Smith TD, Heinrich MC, Ey FS, Bagby GC, Jr. Specific repression of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factor gene expression in interleukin-1-stimulated endothelial cells with antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* 1992;80(3):609-16.
319. Krystal GW, Carlson P, Litz J. Induction of apoptosis and inhibition of small cell lung cancer growth by the quinoxaline tyrphostins. *Cancer research* 1997;57(11):2203-8.
320. Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, *et al.* Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5:S19-27.
321. Krystal GW. Imatinib mesylate (STI571) for myeloid malignancies other than CML. *Leukemia research* 2004;28 Suppl 1:S53-9.
322. Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5:S28-36.
323. Marley SB, Lewis JL, Schneider H, Rudd CE, Gordon MY. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors reproduce the selective antiproliferative effects of imatinib on chronic myeloid leukaemia progenitor cells. *British journal of haematology* 2004;125(4):500-11.
324. Zhou L, An N, Haydon RC, *et al.* Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer letters* 2003;193(2):161-70.
325. Beghini A, Bellini M, Magnani I, *et al.* STI 571 inhibition effect on KITAsn822Lys-mediated signal transduction cascade. *Exp Hematol* 2005;33(6):682-8.
326. Burchert A, Wang Y, Cai D, *et al.* Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 2005;19(10):1774-82.
327. Coppo P, Flamant S, De Mas V, *et al.* BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *British journal of haematology* 2006;134(2):171-9.
328. Hamai A, Richon C, Meslin F, *et al.* Imatinib enhances human melanoma cell susceptibility to TRAIL-induced cell death: Relationship to Bcl-2 family and caspase activation. *Oncogene* 2006;25(58):7618-34.
329. Hazlehurst LA, Argilagos RF, Dalton WS. Beta1 integrin mediated adhesion increases Bim protein degradation and contributes to drug

resistance in leukaemia cells. *British journal of haematology* 2007;136(2):269-75.

330. Einhorn LH, Brames MJ, Heinrich MC, Corless CL, Madani A. Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol* 2006;29(1):12-3.

331. Demetri GD. Targeting c-kit mutations in solid tumors: scientific rationale and novel therapeutic options. *Semin Oncol* 2001;28(5 Suppl 17):19-26.

332. Fletcher CD, Fletcher JA. Testing for KIT (CD117) in gastrointestinal stromal tumors: another HercepTest? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10(3):197-8.

333. Joensuu H, Dimitrijevic S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours. *Ann Med* 2001;33(7):451-5.

334. Surmacz E. Growth factor receptors as therapeutic targets: strategies to inhibit the insulin-like growth factor I receptor. *Oncogene* 2003;22(42):6589-97.

335. Arteaga CL, Kitten LJ, Coronado EB, *et al.* Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J Clin Invest* 1989;84(5):1418-23.

336. Arteaga CL, Osborne CK. Growth inhibition of human breast cancer cells in vitro with an antibody against the type I somatomedin receptor. *Cancer research* 1989;49(22):6237-41.

337. Kalebic T, Tsokos M, Helman LJ. In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. *Cancer research* 1994;54(21):5531-4.

338. Arteaga CL. Interference of the IGF system as a strategy to inhibit breast cancer growth. *Breast cancer research and treatment* 1992;22(1):101-6.

339. Sachdev D, Li SL, Hartell JS, Fujita-Yamaguchi Y, Miller JS, Yee D. A chimeric humanized single-chain antibody against the type I insulin-like growth factor (IGF) receptor renders breast cancer cells refractory to the mitogenic effects of IGF-I. *Cancer research* 2003;63(3):627-35.

340. Blum G, Gazit A, Levitzki A. Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. *Biochemistry* 2000;39(51):15705-12.

341. Pietrzkowski Z, Mulholland G, Gomella L, Jameson BA, Wernicke D, Baserga R. Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer research* 1993;53(5):1102-6.
342. Pietrzkowski Z, Wernicke D, Porcu P, Jameson BA, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer research* 1992;52(23):6447-51.
343. Brodt P, Samani A, Navab R. Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1101-7.
344. Navab R, Chevet E, Authier F, Di Guglielmo GM, Bergeron JJ, Brodt P. Inhibition of endosomal insulin-like growth factor-I processing by cysteine proteinase inhibitors blocks receptor-mediated functions. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(17):13644-9.
345. Bohula EA, Salisbury AJ, Sohail M, *et al.* The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(18):15991-7.
346. D'Cunja J, Shalaby T, Rivera P, *et al.* Antisense treatment of IGF-IR induces apoptosis and enhances chemosensitivity in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumours cells. *Eur J Cancer* 2007;43(10):1581-9.
347. Wang Y, Malkowski M, Hailey J, Turek-Etienne T, Tripodi T, Pachter JA. Screening for small molecule inhibitors of insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) kinase: comparison of homogeneous time-resolved fluorescence and 33P-ATP plate assay formats. *J Exp Ther Oncol* 2004;4(2):111-9.
348. Agatsuma T, Ogawa H, Akasaka K, *et al.* Halohydrin and oxime derivatives of radicicol: synthesis and antitumor activities. *Bioorg Med Chem* 2002;10(11):3445-54.
349. Shen G, Blagg BS. Radester, a novel inhibitor of the Hsp90 protein folding machinery. *Org Lett* 2005;7(11):2157-60.
350. Moulin E, Zoete V, Barluenga S, Karplus M, Winssinger N. Design, synthesis, and biological evaluation of HSP90 inhibitors based on conformational analysis of radicicol and its analogues. *J Am Chem Soc* 2005;127(19):6999-7004.
351. JHJ Pearl RF. Comparison of geldanamycin (NSC-122750) and 17-allylaminogeldanamycin (NSC-33050507D) toxicity in rats. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1997;38:308.

352. Sausville EA, Tomaszewski JE, Ivy P. Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3(5):377-83.
353. Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N. Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 2002;21(8):1159-66.
354. Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, *et al.* Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood* 2007;110(7):2641-9.
355. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 2003;14(8):1169-76.
356. Lang SA, Moser C, Gaumann A, *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):6459-68.
357. Machida H, Nakajima S, Shikano N, *et al.* Heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiates the radiation response of tumor cells grown as monolayer cultures and spheroids by inducing apoptosis. *Cancer science* 2005;96(12):911-7.
358. Premkumar DR, Arnold B, Jane EP, Pollack IF. Synergistic interaction between 17-AAG and phosphatidylinositol 3-kinase inhibition in human malignant glioma cells. *Mol Carcinog* 2006;45(1):47-59.
359. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer research* 2003;63(9):2139-44.
360. Vilenchik M, Solit D, Basso A, *et al.* Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCl, a specific inhibitor of tumor Hsp90. *Chem Biol* 2004;11(6):787-97.
361. Plescia J, Salz W, Xia F, *et al.* Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell* 2005;7(5):457-68.
362. Bompas E, Velay B, Blay JY. Combination treatment of rituximab and imatinib mesylate for simultaneous relapse of MALT lymphoma and a gastrointestinal stromal tumor. *Leukemia & lymphoma* 2004;45(11):2353-4.

363. Fruehauf S, Topaly J, Buss EC, *et al.* Combination of imatinib and established antileukemic treatment modalities for otherwise refractory BCR-ABL positive lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2002;87(12):ECR38.
364. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, *et al.* In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 2001;97(7):1999-2007.
365. Krystal GW. Mechanisms of resistance to imatinib (STI571) and prospects for combination with conventional chemotherapeutic agents. *Drug Resist Updat* 2001;4(1):16-21.
366. Thiesing JT, Ohno-Jones S, Kolibaba KS, Druker BJ. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood* 2000;96(9):3195-9.
367. Tipping AJ, Mahon FX, Zafirides G, Lagarde V, Goldman JM, Melo JV. Drug responses of imatinib mesylate-resistant cells: synergism of imatinib with other chemotherapeutic drugs. *Leukemia* 2002;16(12):2349-57.
368. Tipping AJ, Melo JV. Imatinib mesylate in combination with other chemotherapeutic drugs: in vitro studies. *Seminars in hematology* 2003;40(2 Suppl 2):83-91.
369. Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S. Combination therapy with imatinib mesylate (STI571): synopsis of in vitro studies. *British journal of haematology* 2002;119(1):3-14.
370. Beech DJ, Perer E, Helms J, Gratzer A, Deng N. Insulin-like growth factor-I receptor activation blocks doxorubicin cytotoxicity in sarcoma cells. *Oncology reports* 2003;10(1):181-4.
371. Bertrand FE, Steelman LS, Chappell WH, *et al.* Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells. *Leukemia* 2006;20(7):1254-60.
372. Goetsch L, Gonzalez A, Leger O, *et al.* A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *International journal of cancer* 2005;113(2):316-28.
373. Tseng PH, Wang YC, Weng SC, *et al.* Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel

celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Molecular pharmacology* 2006;70(5):1534-41.

374. Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mascarelli F. HSP90 inhibitors 17-AAG and 17-DMAG target wild-type B-Raf signaling for the proliferation of human uveal melanoma cell lines. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008.

375. Banerji U, Sain N, Sharp SY, *et al.* An in vitro and in vivo study of the combination of the heat shock protein inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin and carboplatin in human ovarian cancer models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008.

376. Huston A, Leleu X, Jia X, *et al.* Targeting Akt and heat shock protein 90 produces synergistic multiple myeloma cell cytotoxicity in the bone marrow microenvironment. *Clin Cancer Res* 2008;14(3):865-74.

377. Sawai A, Chandarlapaty S, Greulich H, *et al.* Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel. *Cancer research* 2008;68(2):589-96.

378. 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):669-81.

379. Yao Q, Weigel B, Kersey J. Synergism between etoposide and 17-AAG in leukemia cells: critical roles for Hsp90, FLT3, topoisomerase II, Chk1, and Rad51. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1591-600.

380. Romanus JA, Tseng LY, Yang YW, Rechler MM. The 34 kilodalton insulin-like growth factor binding proteins in human cerebrospinal fluid and the A673 rhabdomyosarcoma cell line are human homologues of the rat BRL-3A binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163(2):875-81.

381. Stromberg K, Hudgins WR, Fryling CM, *et al.* Human A673 cells secrete high molecular weight EGF-receptor binding growth factors that appear to be immunologically unrelated to EGF or TGF-alpha. *J Cell Biochem* 1986;32(4):247-59.

382. Fryling C, Dombalagian M, Burgess W, Hollander N, Schreiber AB, Haimovich J. Purification and characterization of tumor inhibitory factor-2: its identity to interleukin 1. *Cancer research* 1989;49(12):3333-7.

383. Roberts I, Wienberg J, Nacheva E, Grace C, Griffin D, Coleman N. Novel method for the production of multiple colour chromosome paints for use in karyotyping by fluorescence in situ hybridisation. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(3):241-50.

384. Martinez-Ramirez A, Rodriguez-Perales S, Melendez B, *et al.* Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141(2):138-42.

385. Pagani A, Fischer-Colbrie R, Eder U, Pellin A, Lombart-Bosch A, Bussolati G. Neural and mesenchymal differentiations in Ewing's sarcoma cell lines. Morphological, immunophenotypic, molecular biological and cytogenetic evidence. *International journal of cancer* 1995;63(5):738-43.

386. Szuhai K, Ijszenga M, Tanke HJ, Rosenberg C, Hogendoorn PC. Molecular cytogenetic characterization of four previously established and two newly established Ewing sarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;166(2):173-9.

387. Manara MC, Landuzzi L, Nanni P, *et al.* Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1322-30.

388. Bauer S, Yu LK, Demetri GD, Fletcher JA. Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer research* 2006;66(18):9153-61.

389. Francis LK, Alsayed Y, Leleu X, *et al.* Combination mammalian target of rapamycin inhibitor rapamycin and HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin has synergistic activity in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2006;12(22):6826-35.

390. Banerji U, Walton M, Raynaud F, *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian cancer xenograft models. *Clin Cancer Res* 2005;11(19 Pt 1):7023-32.

391. Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung* 1953;3(6):285-90.

392. Berenbaum MC. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res* 1981;35:269-335.

393. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5(1):85-91.

394. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001;298(3):865-72.
395. Skaletsky R, SaH. Primer3 software (on the web for general users and for biologist programmers). [cited; Available from: <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>].
396. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
397. Jones HE, Dutkowski CM, Barrow D, Harper ME, Wakeling AE, Nicholson RI. New EGF-R selective tyrosine kinase inhibitor reveals variable growth responses in prostate carcinoma cell lines PC-3 and DU-145. *International journal of cancer* 1997;71(6):1010-8.
398. Knowlden JM, Hutcheson IR, Barrow D, Gee JM, Nicholson RI. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 2005;146(11):4609-18.
399. Jones HE, Gee JM, Taylor KM, *et al*. Development of strategies for the use of anti-growth factor treatments. *Endocrine-related cancer* 2005;12 Suppl 1:S173-82.
400. Jones HE, Goddard L, Gee JM, *et al*. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocrine-related cancer* 2004;11(4):793-814.
401. Cooper R, Kaanders JH. Biological surrogate end-points in cancer trials: potential uses, benefits and pitfalls. *Eur J Cancer* 2005;41(9):1261-6.
402. Hotfilder M, Sondermann P, Senss A, van Valen F, Jurgens H, Vormoor J. PI3K/AKT is involved in mediating survival signals that rescue Ewing tumour cells from fibroblast growth factor 2-induced cell death. *British journal of cancer* 2005;92(4):705-10.
403. Mita MM, Mita AC, Chu QS, *et al*. Phase I trial of the novel mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus (AP23573; MK-8669) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2008;26(3):361-7.
404. Guan H, Zhou Z, Wang H, Jia SF, Liu W, Kleinerman ES. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2662-9.

405. Shen C, Lancaster CS, Shi B, Guo H, Thimmaiah P, Bjornsti MA. TOR signaling is a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 2007;27(20):7007-17.
406. Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *British journal of cancer* 2004;91(8):1420-4.
407. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103(2):253-62.
408. Nelsen CJ, Rickheim DG, Tucker MM, Hansen LK, Albrecht JH. Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(6):3656-63.
409. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(45):29864-72.
410. Metcalfe SM, Canman CE, Milner J, Morris RE, Goldman S, Kastan MB. Rapamycin and p53 act on different pathways to induce G1 arrest in mammalian cells. *Oncogene* 1997;15(14):1635-42.
411. Edinger AL, Thompson CB. An activated mTOR mutant supports growth factor-independent, nutrient-dependent cell survival. *Oncogene* 2004;23(33):5654-63.
412. Basciani S, Vona R, Matarrese P, *et al.* Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS letters* 2007;581(30):5897-903.
413. Shaw TJ, Vanderhyden BC. AKT mediates the pro-survival effects of KIT in ovarian cancer cells and is a determinant of sensitivity to imatinib mesylate. *Gynecologic oncology* 2007;105(1):122-31.
414. Stahtea XN, Roussidis AE, Kanakis I, *et al.* Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation. *International journal of cancer* 2007;121(12):2808-14.
415. Yerushalmi R, Nordenberg J, Beery E, *et al.* Combined antiproliferative activity of imatinib mesylate (STI-571) with radiation or cisplatin in vitro. *Experimental oncology* 2007;29(2):126-31.

416. Sanceau J, Wietzerbin J. Downregulation of angiogenic factors in Ewing tumor xenografts by the combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamide. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:170-8.
417. DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. *Cancer* 2007;109(5):813-9.
418. Kreuter M, Paulussen M, Boeckeler J, *et al.* Clinical significance of Vascular Endothelial Growth Factor-A expression in Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 2006;42(12):1904-11.
419. Zhou Z, Bolontrade MF, Reddy K, *et al.* Suppression of Ewing's sarcoma tumor growth, tumor vessel formation, and vasculogenesis following anti vascular endothelial growth factor receptor-2 therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4867-73.
420. Dalal S, Berry AM, Cullinane CJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. *Clin Cancer Res* 2005;11(6):2364-78.
421. Hotfilder M, Lanvers C, Jurgens H, Boos J, Vormoor J. c-KIT-expressing Ewing tumour cells are insensitive to imatinib mesylate (STI571). *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50(2):167-9.
422. Canonici A, Steelant W, Rigot V, *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor, E-cadherin and alpha v integrin form a dynamic complex under the control of alpha-catenin. *International journal of cancer* 2008;122(3):572-82.
423. Allison AS, McIntyre MA, McArdle C, Habib FK. The insulin-like growth factor type 1 receptor and colorectal neoplasia: insights into invasion. *Human pathology* 2007;38(11):1590-602.
424. Girona A, All-Ericsson C, Economou MA, *et al.* The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2006;12(4):1383-91.
425. Mauro L, Surmacz E. IGF-I receptor, cell-cell adhesion, tumour development and progression. *Journal of molecular histology* 2004;35(3):247-53.
426. van Golen CM, Schwab TS, Kim B, *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor expression regulates neuroblastoma metastasis to bone. *Cancer research* 2006;66(13):6570-8.

427. de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, *et al.* Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *The American journal of pathology* 2000;156(3):849-55.
428. Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Gutmann DH. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer research* 2005;65(7):2755-60.
429. Davis MA, Hinerfeld D, Joseph S, *et al.* Proteomic analysis of rat liver phosphoproteins after treatment with protein kinase inhibitor H89 (N-(2-[p-bromocinnamylamino-]ethyl)-5-isoquinolinesulfonamide). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2006;318(2):589-95.
430. Hu W, Wu W, Verschraegen CF, *et al.* Proteomic identification of heat shock protein 70 as a candidate target for enhancing apoptosis induced by farnesyl transferase inhibitor. *Proteomics* 2003;3(10):1904-11.
431. Sandoval JA, Eppstein AC, Hoelz DJ, *et al.* Proteomic analysis of neuroblastoma subtypes in response to mitogen-activated protein kinase inhibition: profiling multiple targets of cancer kinase signaling. *The Journal of surgical research* 2006;134(1):61-7.
432. Singh LP, Jiang Y, Cheng DW. Proteomic identification of 14-3-3zeta as an adapter for IGF-1 and Akt/GSK-3beta signaling and survival of renal mesangial cells. *International journal of biological sciences* 2007;3(1):27-39.
433. Zanini C, Giribaldi G, Mandili G, *et al.* Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *Journal of neurochemistry* 2007;103(4):1344-54.
434. Barati MT, Merchant ML, Kain AB, Jevans AW, McLeish KR, Klein JB. Proteomic analysis defines altered cellular redox pathways and advanced glycation end-product metabolism in glomeruli of db/db diabetic mice. *American journal of physiology* 2007;293(4):F1157-65.
435. Shan SW, Tang MK, Cai DQ, *et al.* Comparative proteomic analysis identifies protein disulfide isomerase and peroxiredoxin 1 as new players involved in embryonic interdigital cell death. *Dev Dyn* 2005;233(2):266-81.
436. Fauquenoy S, Morelle W, Hovasse A, *et al.* Proteomic and glycomic analyses of N-glycosylated structures involved in toxoplasma gondii-host cell interactions. *Mol Cell Proteomics* 2008.

437. Yocum AK, Gratsch TE, Leff N, *et al.* Coupled global and targeted proteomics of human embryonic stem cells during induced differentiation. *Mol Cell Proteomics* 2008.
438. Shields SK, Nicola C, Chakraborty C. Rho guanosine 5'-triphosphatases differentially regulate insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-dependent and -independent actions of IGF-II on human trophoblast migration. *Endocrinology* 2007;148(10):4906-17.
439. Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003;113(2):147-58.
440. Zhang X, Lin M, van Golen KL, Yoshioka K, Itoh K, Yee D. Multiple signaling pathways are activated during insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulated breast cancer cell migration. *Breast cancer research and treatment* 2005;93(2):159-68.
441. Ahn JY, Liu X, Liu Z, *et al.* Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase. *The EMBO journal* 2006;25(10):2083-95.
442. Zhang Y, Akinmade D, Hamburger AW. Inhibition of heregulin mediated MCF-7 breast cancer cell growth by the ErbB3 binding protein EBP1. *Cancer letters* 2008.
443. Zhang Y, Wang XW, Jelovac D, *et al.* The ErbB3-binding protein Ebp1 suppresses androgen receptor-mediated gene transcription and tumorigenesis of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(28):9890-5.
444. Sachdev P, Jiang YX, Li W, *et al.* Differential requirement for Rho family GTPases in an oncogenic insulin-like growth factor-I receptor-induced cell transformation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(28):26461-71.
445. Dong S, Kang S, Gu TL, *et al.* 14-3-3 Integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. *Blood* 2007;110(1):360-9.
446. Ngan CY, Yamamoto H, Takagi A, *et al.* Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer science* 2008;99(1):129-39.
447. Quayle SN, Sadar MD. 14-3-3 sigma increases the transcriptional activity of the androgen receptor in the absence of androgens. *Cancer letters* 2007;254(1):137-45.

448. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Lachance S, Pineau CA, Clarke AE. Lymphoma in a patient with systemic lupus erythematosus. *Nature clinical practice* 2006;2(10):570-4; quiz 5.

449. Merino R, de Inocencio J, Garcia-Miguel P, Garcia-Consuegra J. Lymphoproliferative disorders in paediatric rheumatic diseases. A report of two cases. *Clinical and experimental rheumatology* 2004;22(5):649-50.

450. Spalding SJ, Hennon T, Dohar J, Arkachaisri T. Neonatal lupus erythematosus complicated by mucocutaneous and visceral hemangiomas. *Lupus* 2007;16(11):904-7.

451. Manara MC, Perdichizzi S, Serra M, *et al.* The molecular mechanisms responsible for resistance to ET-743 (Trabectedin; Yondelis) in the Ewing's sarcoma cell line, TC-71. *International journal of oncology* 2005;27(6):1605-16.

452. Hettinga JV, Lemstra W, Meijer C, *et al.* Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells. *International journal of cancer* 1996;67(6):800-7.

453. Norton PM, Latchman DS. Levels of the 90kd heat shock protein and resistance to glucocorticoid-mediated cell killing in a range of human and murine lymphocyte cell lines. *Journal of steroid biochemistry* 1989;33(2):149-54.

454. Panner A, Murray JC, Berger M, Pieper RO. Heat shock protein 90alpha recruits FLIPs to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. *Cancer research* 2007;67(19):9482-9.

455. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International journal of cancer* 1998;79(5):468-75.

456. Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.

457. Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2004;3(12):530-6.

458. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A. Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates

t kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):584-90.

459. Mitsiades CS, Mitsiades, McMullan CJ, *et al.* Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 2006;107(3):1092-100.

460. Terry J, Lubieniecka JM, Kwan W, Liu S, Nielsen TO. Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin prevents synovial sarcoma proliferation via apoptosis in in vitro models. *Clin Cancer Res* 2005;11(15):5631-8.

461. Meyer PN, Roychowdhury S, Kini AR, Alkan S. HSP90 inhibitor 17AAG causes apoptosis in ATRA-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia research* 2008;32(1):143-9.

462. Newcomb EW, Lukyanov Y, Schnee T, *et al.* The geldanamycin analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the growth of GL261 glioma cells in vitro and in vivo. *Anti-cancer drug* 2007;18(8):875-82.

463. Yu W, Rao Q, Wang M, *et al.* The Hsp90 inhibitor 17-allylamide-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the Asn822Lys KIT mutation and down-regulates KIT protein level. *Leukemia research* 2008;30(5):575-82.

464. Zsebik B, Citri A, Isola J, Yarden Y, Szollosi J, Vereb G. Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunology letters* 2006;104(1-2):146-55.

465. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(42):39858-66.

466. Muter PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N. Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-T-dependent pathway. *Cancer research* 2002;62(11):3132-7.

467. Bagatell R, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L. Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *International journal of cancer* 2005;113(2):179-88.

468. Zheng FF, Kuduk SD, Chiosis G, *et al.* Identification of a geldanamycin dimer that induces the selective degradation of HER-family tyrosine kinases. *Cancer research* 2000;60(8):2090-4.

469. Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, *et al.* Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006;12(11 Pt 1):3532-40.

470. Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ. Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *Journal of the National Cancer Institute* 2002;94(22):1673-9.

471. Radujkovic A, Schad M, Topaly J, *et al.* Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL--Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. *Leukemia* 2005;19(7):1198-206.

472. Barnes DJ, De S, van Hensbergen P, Moravcsik E, Melo JV. Different target range and cytotoxic specificity of adaphostin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in imatinib-resistant and sensitive cell lines. *Leukemia* 2007;21:421-6.

473. Topaly J, Schad M, Laufs S, Melo JV, Zeller WJ, Fruehauf S. Cross-resistance of imatinib mesylate and 17-AAG in imatinib-resistant cells that overexpress BCR-ABL. *British journal of haematology* 2003;121(4):672-3.

474. Nielsen TO, Andrews HN, Cheang M, *et al.* Expression of the insulin-like growth factor I receptor and urokinase plasminogen activator in breast cancer is associated with poor survival: potential for intervention with 17-allylamino geldanamycin. *Cancer research* 2004;64(1):286-91.

475. Bagatell R, Gore L, Egorin MJ, *et al.* Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors: a pediatric oncology experimental therapeutics investigators consortium study. *Clin Cancer Res* 2007;13(6):1783-8.

476. Williams CR, Tabios R, Linehan WM, Neckers L. Intratum injection of the Hsp90 inhibitor 17AAG decreases tumor growth and induces apoptosis in a prostate cancer xenograft model. *The Journal of urology* 2007;178(4 Pt 1):1528-32.

477. Scotlandi K, Maini C, Manara MC, *et al.* Efficacy of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer gene therapy* 2002;9(3):296-307.

478. Druker BJ. Taking aim at Ewing's sarcoma: is KIT a target and will imatinib work? *Journal of the National Cancer Institute* 2002;94(22):1660-1.
479. Scotlandi K, Manara MC, Strammiello R, *et al.* C-kit receptor expression in Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions. *J Clin Oncol* 2003;21(10):1952-60.
480. Mora J CT, de Alava E, Torres C, Rodriguez E, Rios J and Cardesa A. Antibody-based profiling of growth signalling pathways in Ewing Sarcoma primary tumors.

ANEXOS